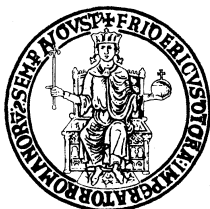


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN
“RIPRODUZIONE, SVILUPPO E ACCRESCIMENTO
DELL’UOMO”

COORDINATORE: Prof. Claudio Pignata

TESI DI DOTTORATO

***“Ruolo dei fattori angiogenetici e dei peptidi vasoattivi nella
fisiopatologia ostetrico-ginecologica”***

TUTORE
Prof. Costantino Di Carlo

CANDIDATO
Dott. Giuseppe Cerrota

XXII CICLO

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

Capitolo 1: Angiogenesi

1.1 Introduzione.....	pag. 4
1.2 Fattori coinvolti nell'invasione tissutale.....	pag. 7
1.3 Obiettivi degli studi.....	pag. 10

Capitolo 2: Endometriosi

2.1 Introduzione.....	pag. 11
2.2 Etiologia.....	pag. 14
2.3 Fattori di rischio.....	pag. 16
- Età.....	pag. 16
- Classe sociale, razza e stile di vita.....	pag. 16
- Fattori riproduttivi e mestruali.....	pag. 17
- Utilizzo di contraccettivi orali.....	pag. 18
- Fattori genetici.....	pag. 18
2.4 Patogenesi.....	pag. 20
- Reflusso tubarico di sangue mestruale ed impianto dei frustoli endometriali nei vari tessuti.....	pag. 20
- Disseminazione per via linfatica o per via ematica.....	pag. 22
- Metaplasia dell'epitelio di origine celomatica o mülleriana.....	pag. 22
- Disseminazione chirurgica.....	pag. 23
- Predisposizione genetica e alterazioni del sistema immunitario.....	pag. 24
2.5 Endometriosi quale malattia invasiva.....	pag. 25
2.6 Endometriosi e sistema immunitario.....	pag. 27
- Ruolo dell'immunità umorale.....	pag. 29
- Citochine.....	pag. 30
- Il ruolo delle cellule Natural Killer.....	pag. 33
- L'apoptosi nell'endometriosi.....	pag. 35
- Aumento di adesione.....	pag. 36
- Trait d'union tra sistema immune e sistema riproduttivo: endometriosi e infertilità.....	pag. 37
2.7 Scopo dello studio	
a) Potenziale invasivo delle cellule endometriali di pazienti endometriosiche.....	pag. 42
2.8 Materiali e metodi.....	pag. 43
- Immunoistochimica.....	pag. 46
Anticorpi.....	pag. 46
Metodo immunoenzimatico.....	pag. 46
- Analisi computerizzata di immagine.....	pag. 47
- RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) semiquantitativa.....	pag. 48

- Analisi statistica.....	pag. 51
2.9 Risultati.....	pag. 52
2.10 Discussione.....	pag. 60
2.11 Conclusioni.....	pag. 64
Capitolo 3: Sviluppo e patologia della placenta	
3.1 Introduzione.....	pag. 65
3.2 Sviluppo della placenta.....	pag. 66
- Prime fasi della placentazione: il primo trimestre.....	pag. 66
- Invasione citotrofoblastica extravillosa.....	pag. 68
- Sviluppo dei villi coriali.....	pag. 74
3.3 Fattori di crescita nell'angiogenesi placentare.....	pag. 76
3.4 Insufficienza placentare.....	pag. 79
- Pre-eclampsia.....	pag. 79
- IUGR.....	pag. 81
3.5 Scopo dello studio	
b) Espressione dei fattori angiogenici e dei peptidi vasoattivi	
nelle placente normali ed affette da pre-eclampsia.....	pag. 86
3.6 Materiali e metodi.....	pag. 88
- Immunoistochimica.....	pag. 89
Anticorpi.....	pag. 89
Metodo immunoenzimatico.....	pag. 89
- Analisi computerizzata di immagine.....	pag. 90
- RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase	
Chain Reaction) semiquantitativa.....	pag. 91
- Analisi statistica.....	pag. 93
3.7 Risultati.....	pag. 94
3.8 Discussione.....	pag. 101
3.9 Conclusioni.....	pag. 106
Capitolo 4: Bibliografia.....pag. 107	
Capitolo 5: Pubblicazione scientifica.....pag. 122	
1) Giovanni A. Tommaselli, M.D., Ph.D., Giuseppe Cerrota, M.D.; Costantino Di Carlo, M.D.; Paola Di Iorio, M.D., Giuseppe Bilfulco, Ph.D., M.D.; Carmine Nappi, M.D. <i>Placental expression of VEGF, angiopoietins and vasoactive peptides in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation.</i> Submitted to Fertil Steril.....	pag. 126

CAPITOLO 1 - ANGIOGENESI

1.1 INTRODUZIONE

Il processo dell'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi in un'area avascolare a partire da endoteli preesistenti; il fenomeno implica la degradazione proteolitica della membrana basale dei vasi, la proliferazione e la migrazione di cellule endoteliali nonché l'allineamento delle cellule migrate a formare strutture tubulari (neovasi). Il processo di degradazione della membrana basale da parte delle cellule endoteliali, finalizzato all'invasione dello stroma dei tessuti adiacenti richiede la cooperazione tra il sistema che ruota intorno al PA (plasminogen activator) e le MMPs (metalloproteinasi della matrice). L'u-PA (urokinase-type plasminogen activator) e il t-PA (tissue-type plasminogen activator) sono proteasi seriniche che convertono il plasminogeno in plasmina. L'attività fibrinolitica nel sangue è regolata dal t-PA; l'attivazione del plasminogeno nei tessuti, invece, dall'u-PA. Una volta secreto, l'u-PA si lega al suo recettore u-PAR ed il risultato è il processo d'invasione e migrazione cellulare. La plasmina degrada diversi componenti della matrice extra-cellulare (ECM) quali fibrina, fibrinonectina, laminina, *core proteins* di proteoglicani e attiva MMP-1, MMP-3 e MMP-9. Evidenze riguardanti il processo di "rimodellamento" della matrice extracellulare risalgono già al 1992, agli studi di *Spuijbroek* [1], che aveva dimostrato la presenza di

incrementate concentrazioni di frammenti di pro-collagene tipo III nel fluido peritoneale di donne con endometriosi.

L'angiogenesi si attiva rapidamente, inoltre, in risposta a condizioni ipossiche o ischemiche; la vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO), infatti, è un prerequisito per la partecipazione delle cellule endoteliali al processo di angiogenesi.

In riferimento al fenomeno dell'angiogenesi, va fatta un'importante distinzione tra angiogenesi fisiologica ed angiogenesi patologica; sebbene molti regolatori positivi e negativi siano coinvolti in entrambe, la proliferazione di cellule endoteliali è altamente controllata nell'angiogenesi fisiologica, mentre in quella patologica si verifica un'incontrollata crescita di microvasi in differenti tessuti.

I fenomeni angiogenetici, alla base di numerosi processi dello sviluppo embrionario, sono implicati, nella vita adulta, soprattutto in alcune condizioni patologiche quali l'artrite reumatoide, la retinopatia diabetica, il processo di guarigione delle ferite e la crescita delle lesioni tumorali. Esistono tuttavia processi angiogenetici "fisiologici", essenziali per la riproduzione: ad esempio, nell'ovaio, nel normale processo di rimodellamento tissutale dell'endometrio durante il ciclo mestruale e nella placenta.

Il fenomeno dipende, in realtà, da un preciso equilibrio tra la regolazione angiogenetica positiva e quella negativa; alcune comuni patologie ginecologiche, inclusi il sanguinamento uterino anomalo e l'endometriosi, sono

dovute proprio a disordini della regolazione dell'angiogenesi. È ormai noto, inoltre, come il sistema immunitario abbia un ruolo importante nella regolazione dell'angiogenesi: i leucociti possono indurre la proliferazione vascolare e specifiche citochine derivate dai leucociti stessi promuovono l'angiogenesi [2].

1.2 FATTORI COINVOLTI NELL'INVASIONE TISSUTALE E NELLA ANGIOGENESI

Le **metalloproteinasi della matrice (MMPs)** sono enzimi in grado di degradare virtualmente tutte le componenti della matrice extracellulare. Tali molecole vengono prodotte da cellule epiteliali, fibroblasti e cellule infiammatorie; posseggono un pre-dominio (un peptide segnale per la secrezione), un pro-dominio (rimosso a seguito dell'attivazione proteolitica), un dominio catalitico (contenente uno ione Zn) e un dominio contenente un sito di legame per il TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase).

L'attività di MMPs, plasmina e u-PA è regolata rispettivamente da TIMP, α_2 -antiplasmina, PAI (plasminogen activator inhibitor). PA e MMP sono secreti con i loro inibitori, garantendo un controllo rigoroso dell'attività proteolitica locale, per proteggere la normale struttura tissutale. Tale regolazione viene meno durante la crescita tumorale e la formazione di metastasi.

Il **VEGF** (Vascular endothelial growth factor) rappresenta uno dei più potenti e selettivi fattori di crescita con attività angiogenetica essendo altamente mitogeno, in maniera specifica, per le cellule endoteliali vascolari, e riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica. Oltre al VEGF (VEGF-A), sono stati identificati anche altri 4 geni

strutturalmente correlati al VEGF i cui prodotti sono conosciuti come PIGF (placental growth factors): VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E.

In vitro, VEGF stimola la degradazione, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali (azione attribuita in parte all'attivazione mediata da NO e MAPK) e induce in tali cellule l'espressione di u-PA, PAI-1, u-PAR e MMP-1 [3].

Diversi meccanismi sono coinvolti nella regolazione del gene che codifica per il VEGF. Un ruolo rilevante viene attribuito alla tensione tissutale di ossigeno, come dimostrato dall'aumento reversibile dei livelli di mRNA-VEGF in condizioni di ipossia in vivo e in vitro. L'aumento dell'espressione di mRNA-VEGF è mediato principalmente dal fattore di trascrizione HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), che si lega ad un sito di riconoscimento nella regione promotrice del gene del VEGF [4]. È stato osservato, inoltre, che il messaggero del VEGF è regolato a livello trascrizionale e post-trascrizionale anche dal deficit di glucosio, suggerendo che la trascrizione del gene del VEGF può essere indotta da stimoli stressanti [4].

Inducono l'espressione del VEGF anche fattori di crescita quali TGF- α , TGF- β ed EGF (epidermal growth factor), mediatori della risposta infiammatoria quali IL (interleuchine) e PGE₂, IGF-1 (insulin-like growth factor 1) [5], l'attivazione delle protein-kinasi C ed A, l'oncogene ras e l'overespressione di v-raf o v-src, alcune proteine regolatrici del ciclo cellulare quali p53 ed il soppressore del gene di Von Hippel-Lindau (VHL) [6].

L'**Ang-1 (angiopoietina 1)** è una citochina in grado di potenziare gli effetti di altri fattori angiogenetici quali, soprattutto, il VEGF. Essa, infatti, non è in grado da sola di promuovere la crescita di cellule endoteliali, ma interviene attivamente nell'angiogenesi solo dopo che altri fattori angiogenetici iniziano ad esplicare il loro effetto [7].

L'**Ang-2 (angiopoietina 2)** rappresenta l'antagonista naturale dell'Ang-1 e compete per il suo recettore TIE-2, appartenente alla famiglia delle tirosin-kinasi. Essa viene espressa precocemente in cellule endoteliali e in diverse linee cellulari tumorali non endoteliali. In alcuni modelli sperimentali è stato dimostrato che l'azione destabilizzante la vascolarizzazione dell'Ang-2 conduce, in ultima analisi, ad una promozione dell'attività angiogenetica del VEGF e dell'Ang-1 [8].

1.3 OBIETTIVI DEGLI STUDI

Abbiamo voluto valutare il coinvolgimento di fattori angiogenetici, metalloproteinasi e peptidi vasoattivi nella patogenesi di tre patologie di vasta importanza nella pratica ostetrico-ginecologica, quali l'endometriosi, la pre-eclampsia e l'IUGR, che riconoscono nel loro movens patogenetico il coinvolgimento della angiogenesi.

A questo scopo abbiamo valutato il potenziale "invasivo" delle cellule endometriali di pazienti affette da endometriosi, paragonandole ai corrispettivi ectopici (foci endometriali e parete di endometrioma).

Inoltre, abbiamo voluto mettere a confronto l'espressione, il contenuto e la localizzazione proteica dei fattori angiogenetici e dei peptidi vasoattivi di placente "normali" rispetto a quelle da gravidanze affette da patologia "placentare" ovvero pre-eclampsia e IUGR.

CAPITOLO 2 - ENDOMETRIOSI

2.1 INTRODUZIONE

L'endometriosi è una condizione di patologia provocata dalla disseminazione o dalla crescita di tessuto endometriale in sedi anomale o dall'insorgenza del tessuto endometriale, per un processo di metaplasia, al di fuori della sede abituale. La malattia viene considerata una eterotopia.

L'endometrio ectopico risente, come la normale mucosa uterina, degli stimoli da parte degli ormoni ovarici, soprattutto estrogeni, ed assume quindi atteggiamenti proliferativi e funzionali (compreso lo sfaldamento e il sanguinamento in epoca mestruale) simili a quelli che si verificano nell'endometrio normale.

È quindi una malattia quasi sempre dell'età feconda e nella quale è presente l'attività ovarica; si verifica eccezionalmente in età puberale e raramente nell'adolescenza. Tende a regredire nella post-menopausa o dopo castrazione. È più frequente nelle nullipare [9-11].

L'endometrio ectopico si reperisce di solito sul peritoneo pelvico e negli organi pelvici (ovaie, tube, intestino, retto-sigma, legamenti uterini, setto retto-vaginale, vescica, ecc.) (Figura 1).

L'endometriosi può inoltre insorgere in organi e tessuti al di fuori o lontani dalla pelvi (ombelico, vulva, cicatrici di interventi laparotomici, appendice, polmoni, ecc.) [12].

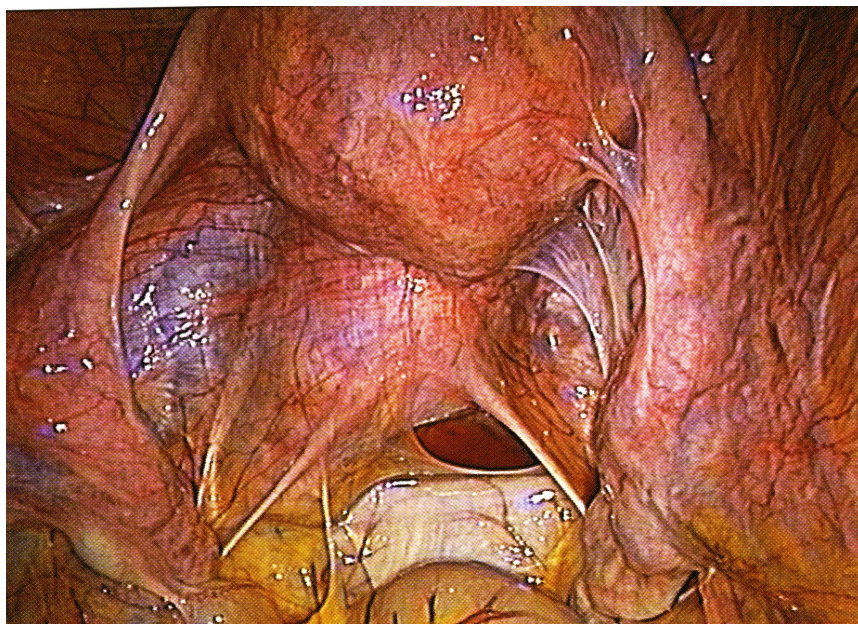


Figura 1. Quadro di endometriosi moderata.

2.2 ETIOLOGIA

L'etiopatogenesi dell'endometriosi rimane a tutt'oggi non ancora chiarita. Sebbene l'esatta prevalenza dell'endometriosi nella popolazione generale non sia conosciuta, essa rappresenta una patologia frequente tra le donne in età riproduttiva. Dati ONU riguardanti la malattia, infatti, attestano che circa 3 milioni di donne in Italia soffrono di endometriosi, 14 milioni nell'Unione Europea (il 7-10 % della popolazione generale femminile), 5,5 milioni nel Nord America. Le stime di incidenza della patologia (che possono però variare enormemente) si attestano intorno al 7-10 % di donne in età fertile. Nel 2004 nel nostro Paese una rilevazione del Census Bureau ha evidenziato una prevalenza di 2.902.873 persone su una popolazione di circa 58.057.477 abitanti.

L'endometriosi rappresenta una delle patologie ginecologiche più controverse: infatti, nonostante il particolare interesse riservatole negli ultimi decenni dall'intera comunità scientifica e la notevole esperienza clinica acquisita in materia, resta, ad oggi, un enigma da risolvere nella quasi totalità delle sue radici ed implicazioni fisiopatologiche.

Un ampio studio italiano, condotto dal “Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi” comprendente 23 centri distribuiti in tutto il Paese, ha dimostrato una prevalenza di endometriosi pelvica in pazienti sottoposte ad intervento chirurgico per sterilità, dolore pelvico, patologia ovarica benigna e

fibromi uterini rispettivamente del 30, 45, 35 e 12 %. Nel gruppo di pazienti affette da sterilità, inoltre, la prevalenza dell'endometriosi è risultata del 51% allo stadio I, del 22% allo stadio II, del 20 % allo stadio III e del 7% allo stadio IV. Percentuali simili sono state osservate in caso di fibroma uterino e dolore pelvico, mentre in donne con patologia ovarica benigna lo stadio III è risultato il più frequente [13].

2.3 FATTORI DI RISCHIO

- Età

L'età è la sola caratteristica socio-demografica per la quale è stata osservata un'associazione positiva con la malattia. L'endometriosi pelvica è rara prima del menarca e tende a diminuire dopo la menopausa [14]. La patologia, comunque, risulta essere poco frequente nelle adolescenti [15].

- Classe sociale, razza e stile di vita

È stato osservato che l'incidenza dell'endometriosi risulta essere aumentata nelle donne di classe sociale più elevata, nelle donne asiatiche rispetto alle caucasiche, e ancora nelle donne bianche rispetto alle nere [16, 17]. Questi risultati sono tuttavia influenzati da diversi bias quali la differente possibilità di usufruire di cure mediche adeguate o di ricorrere alla contraccezione, o ancora la parità e la diversa storia ginecologica (fattori mestruali).

In studi più recenti, altri autori non hanno riscontrato alcuna associazione tra endometriosi e classe sociale [18].

La prevalenza dell'endometriosi, inoltre, diminuisce in rapporto ad alcuni stili di vita che includono il fumo di sigaretta e l'esercizio fisico, che sembrerebbero implicati in una diminuzione dei livelli sierici di estrogeni; un aumentato rischio sembra invece essere associato al consumo di alcool e

caffaina [18, 19]. Sembra, infatti, che l'endometriosi sia una patologia estrogeno-dipendente e che gli estrogeni abbiano un ruolo di primaria importanza nella crescita e nel mantenimento delle lesioni endometriosiche.

Inoltre, l'aumentata incidenza della malattia endometriosica nei paesi industrializzati ha condotto alcuni autori ad indagare sulla possibile associazione tra uno dei più dannosi componenti ambientali inquinanti, la diossina, e l'endometriosi [20, 21] con risultati discordanti: un solo studio, infatti, riporta che il 18% delle donne con endometriosi risultava essere positiva alla diossina rispetto al 3% di donne senza endometriosi [22].

- Fattori riproduttivi e mestruali

È stato osservato che il menarca precoce (≤ 12 anni), i cicli mestruali brevi, la durata maggiore del ciclo (> 7 giorni) e l'uso di tamponi sono associati con un rischio più elevato di sviluppare endometriosi; cicli mestruali > 35 giorni sembrano invece avere un effetto protettivo [23-25].

Lo sviluppo di endometriosi nei primi anni dopo il menarca è stato associato con un alto tasso di patologie ostruttive del tratto genitale che includono la stenosi cervicale, l'atresia cervicale e l'imene imperforato. Sembra inoltre che, nel gruppo di donne affette da anomalie Mülleriane, quelle con ostacolato deflusso al sangue mestruale, presentino un rischio maggiore di sviluppare endometriosi rispetto alle donne non affette da tali anomalie dello sviluppo embriogenetico [18].

Riguardo alla storia ostetrica, dati clinici ed epidemiologici suggeriscono che la parità è inversamente associata al rischio di sviluppare la malattia endometriosica, indicando un effetto protettivo diretto dello stato gravidico. Tra le pluripare, si è osservato un lineare decremento del rischio con l'aumentare del numero di figli nati vivi e del periodo di lattazione [26]: ciò può essere dovuto ad una ridotta esposizione ai flussi mestruali.

- Utilizzo di contraccettivi orali

I dati relativi all'associazione tra assunzione di contraccettivi orali (CO) ed endometriosi sono contrastanti.

Alcuni autori hanno ipotizzato che l'uso di CO è associato ad un elevato rischio di sviluppare la patologia [27, 28]. Secondo studi più recenti, le utilizzatrici di CO avrebbero un rischio di malattia inferiore. I CO, dunque, potrebbero prevenire lo sviluppo di endometriosi rendendo quantitativamente minore il flusso mestruale con un conseguente ridotto rischio di reflusso mestruale trans-tubarico in cavità peritoneale. I CO sono, infatti, stati proposti come terapia a donne con endometriosi sintomatica [29, 30].

- Fattori genetici

I dati clinici che sostengono l'ipotesi di una possibile base genetica dell'endometriosi sono: la ricorrenza familiare dell'endometriosi, la concordanza in gemelli monozigoti, l'età di insorgenza simile in sorelle non

gemelle entrambe affette, la prevalenza aumentata di 6-9 volte rispetto alla popolazione generale nelle parenti di primo grado di donne affette, una prevalenza di malattia, determinata mediante risonanza magnetica, del 15% nelle sorelle di donne con endometriosi grave (Tabella 1) [31-34]. È dunque ipotizzabile che la trasmissione dell'endometriosi sia riconducibile ad un pattern poligenico/multifattoriale.

L'OXEGENE study, uno studio britannico condotto allo scopo di indagare le cause genetiche della malattia endometriosica, e volto ad identificare i loci coinvolti nello sviluppo della malattia utilizzando analisi di linkage, ha confermato una tendenza familiare allo sviluppo di endometriosi [34, 35].

Tabella 1. Associazioni genetiche dell'endometriosi.

<i>Autori</i>	<i>Risultati</i>
Simpson et al., 1980	Rischio di endometriosi aumentato di 6 volte nelle sorelle di donne affette
Moen e Magnus, 1993	Rischio relativo di endometriosi aumentato (OR 7.2 (p<0.05)) con una parente di primo grado affetta da malattia
Moen, 1994	Sei sorelle di otto gemelle monozigoti (75%) con endometriosi anch'esse con malattia
Kennedy et al., 1998	Prevalenza di endometriosi in parenti di primo grado di donne affette (14,3%).

2.4 PATOGENESI

Molte teorie hanno cercato di spiegare il meccanismo patogenetico della malattia.

- Reflusso tubarico di sangue mestruale ed impianto dei frustoli endometriali nei vari tessuti

I frustoli di mucosa uterina non solo avrebbero la capacità di impiantarsi, ma sarebbero poi stimolati a crescere dalla ciclica azione degli estrogeni ovarici. Con i cicli mestruali, tali impianti sarebbero soggetti a proliferazione e a sanguinamento, con la conseguente possibilità di ulteriori impianti endometriali (Figura 2).

Dal momento che la mestruazione retrograda è così frequente da essere considerata un fenomeno fisiologico, la possibilità di sviluppare endometriosi dipenderebbe dal rapporto tra quantità di endometrio refluito in cavità peritoneale e recettività intrinseca all'impianto delle cellule endometriali.

Questa teoria spiega in modo soddisfacente le localizzazioni endopelviche ed endoaddominali della malattia, ma non spiega altre localizzazioni come quelle vaginali, vulvari, perineali, polmonari, ecc.

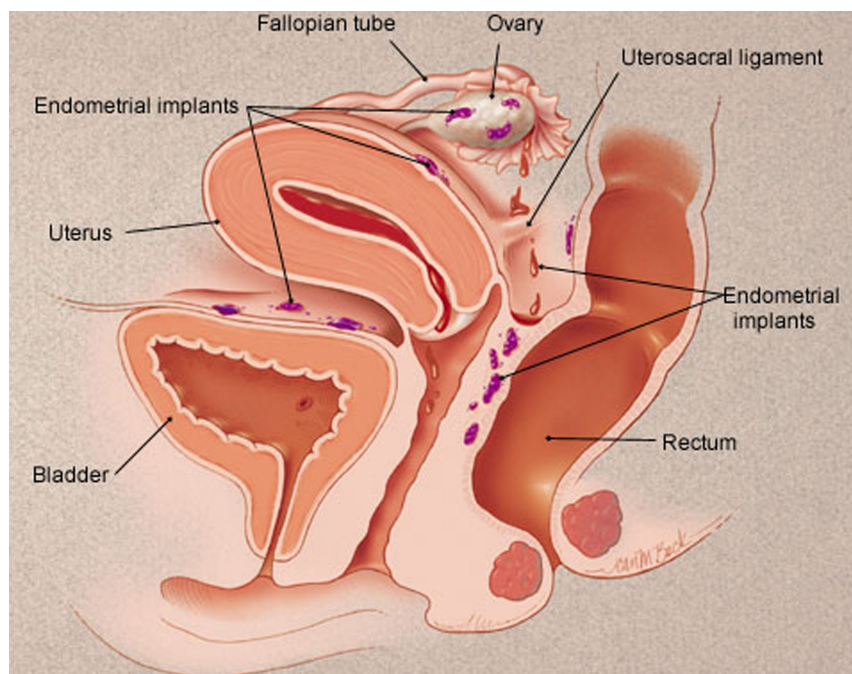


Figura 2. Anatomia del reflusso tubarico.

- Disseminazione per via linfatica o per via ematica

Le cellule endometriali vitali potrebbero entrare nei vasi sanguigni e linfatici con conseguente embolizzazione ed impianto in sedi ectopiche. Questa teoria potrebbe spiegare la presenza di endometriosi a livello polmonare, renale, della muscolatura scheletrica e dello spazio subaracnoideo (diffusione ematogena). Allo stesso modo, i focolai endometriosici riscontrati in alcuni linfonodi potrebbero essere il risultato di una diffusione linfatica.

- Metaplasia dell'epitelio di origine celomatica o mülleriana

Secondo tale teoria, l'endometrio ectopico originerebbe da cellule totipotenti mesoteliali del peritoneo attraverso un processo di metaplasia. Questa teoria assume maggior valore in virtù del fatto che l'epitelio celomatico, che dà origine alle cellule epiteliali dei dotti Mülleriani, si differenzia anche in cellule epiteliali pleuriche e peritoneali, così come in cellule della superficie ovarica. La possibilità che la metaplasia potesse essere determinata da fattori di induzione fu suggerita per la prima volta da Novak. I fattori capaci di indurre questo tipo di metaplasia del peritoneo sono gli ormoni sessuali, il reflusso tubarico di detriti endometriali, i processi flogistici. La teoria della metaplasia celomatica può spiegare la presenza di endometriosi primitiva del setto retto-vaginale e di certe localizzazioni a livello del torace o degli arti perché il tessuto celomatico partecipa anche all'organogenesi di questi apparati. Ciò potrebbe spiegare anche la segnalazione di rarissimi casi di

endometriosi in pazienti con agenesia utero-vaginale e il reperto di endometriosi nelle cisti dermoidi.

Sono stati descritti anche focolai di endometriosi in soggetti maschili. Si pensa che la presenza di tessuto endometriale negli uomini possa derivare da resti di cellule mülleriane, sviluppatasi da residui embrionali di abbozzi genitali quali l'utricolo prostatico e l'appendice testis, a seguito di una stimolazione a seguito di cure con estrogeni. Le segnalazioni riguardano, infatti, soggetti con carcinoma prostatico trattati con clorotrianisene (TACE), un estrogeno non steroideo.

- Disseminazione chirurgica

La disseminazione chirurgica sembra verosimilmente essere responsabile di certe localizzazioni, come quella sulle cicatrici laparotomiche, che si verificano dopo interventi di apertura della cavità uterina (miomectomia, metroplastica) o comunque di interventi attuati su organi pelvici, che possono essere responsabili delle localizzazioni a livello vulvo-perineale.

Più difficilmente l'endometriosi si forma nella cicatrice addominale dopo taglio cesareo, o nella cicatrice della sutura di una perineorrafia eseguita per lacerazione nel corso del parto, o infine nel punto dell'infissione dell'ago per un'amniocentesi. Ciò significa che, quando, a causa di uno stato gravidico, l'endometrio ha subito la trasformazione deciduale ha meno tendenza ad impiantarsi.

- Predisposizione genetica e alterazioni del sistema immunitario

I fattori genetici coinvolti nello sviluppo della malattia endometriosica sono già stati ampiamente trattati nel paragrafo “Fattori di rischio”.

I risultati di molte ricerche hanno fatto ipotizzare che l'endometriosi sia dovuta ad un'alterazione del sistema immunitario e precisamente ad una diminuzione dell'immunità cellulo-mediata e dell'immunità umorale [36, 37].

2.5 ENDOMETRIOSI QUALE MALATTIA “INVASIVA”

L’“impianto” ectopico di cellule endometriali, refluite per via retrograda durante la mestruazione all’interno della cavità peritoneale, rappresenta dunque una delle più importanti teorie etiopatogenetiche dello sviluppo dell’endometriosi. La mestruazione retrograda, in realtà, è un fenomeno parafisiologico che non giustifica la reale incidenza della malattia endometriosica; va pertanto ipotizzata l’esistenza di “fattori permissivi” capaci di favorire l’impianto ectopico di cellule endometriali.

L’endometriosi pelvica (la forma più frequente della malattia) si associa con (Figura 3):

- alterazioni intrinseche dell’endometrio refluito in cavità endometriale;
- alterazione della funzione dell’immunità cellulo-mediata e della risposta cellulo-mediata (diminuita citotossicità dei NK verso il tessuto endometriale autologo ed eterologo);
- aumento dei macrofagi peritoneali e dei loro prodotti (citochine e fattori di crescita) e della risposta umorale (aumento dell’attività dei linfociti B e degli auto-anticorpi);
- neoangiogenesi.

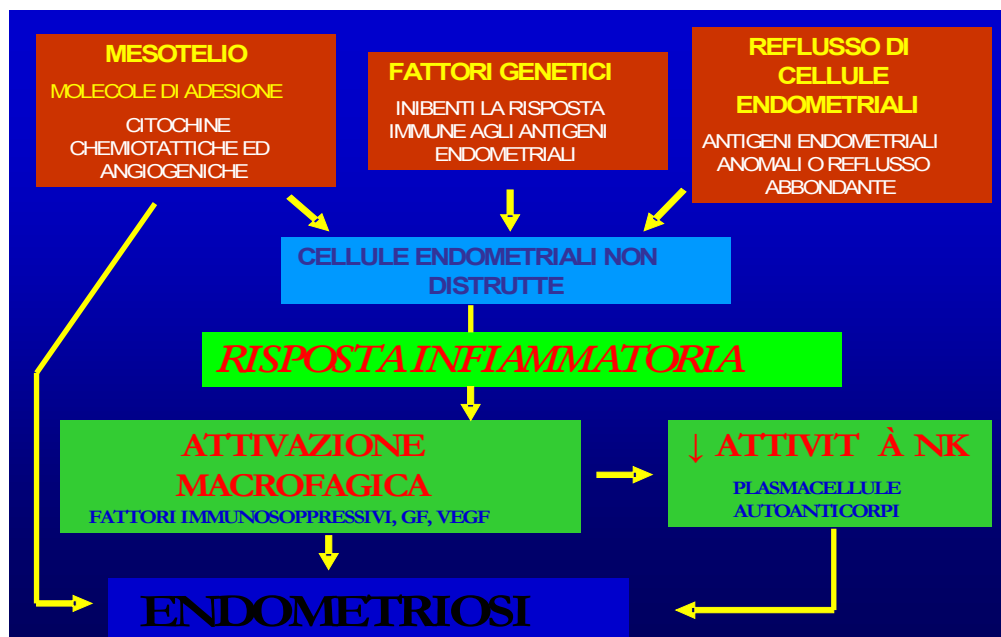


Figura 3. Meccanismi alla base dello sviluppo dell'endometriosi.

2.6 ENDOMETRIOSI E SISTEMA IMMUNITARIO

Gli aspetti immunologici della malattia endometriosica rappresentano un settore di ricerca e di studio molto interessante. Esiste una chiara evidenza che la funzione del sistema immunitario in pazienti con endometriosi è alterata.

L'alterazione del normale funzionamento del sistema immunitario può riguardare sia la risposta umorale che quella cellulo-mediata. Nonostante l'eziologia delle alterazioni immunologiche osservate non sia del tutto ben chiarita, si ritiene possibile un'associazione con l'espressione di molecole HLA-I e HLA-II.

Uno studio di *Venturini et al.* [38] suggerisce che l'attività linfocitaria citotossica sia dipendente dall'espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I presenti sulla superficie delle cellule endometriali: la quantità di tali molecole condizionerebbe il consenso alla lisi. È stato inoltre dimostrato che la presenza dell'allele HLA-B7 può inibire l'attività litica suggerendo, quindi, che lo sviluppo dell'endometriosi potrebbe essere geneticamente controllato.

In sostanza l'endometriosi, secondo queste teorie, potrebbe essere considerata una malattia autoimmune con presenza di immunocomplessi nelle ghiandole endometriali e di autoanticorpi circolanti.

Massobrio et al. [39] sono del parere che il sistema immunitario svolga un ruolo determinante nella patogenesi dell'endometriosi provocando una

cascata di eventi caratterizzata dalla adesione al mesotelio delle cellule endometriali sopravvissute, dalla conseguente reazione infiammatoria che si sviluppa, dall'attivazione dei macrofagi, dal rilascio di fattori immunosoppressivi che inibiscono la distruzione dell'endometrio ectopico.

Circa l'ipotesi patogenetica fondata sulla teoria della mestruazione retrograda, si obietta che circa l'80-90% delle donne con flussi mestruali e tube aperte presentano questo fenomeno, ma soltanto nel 10-15% delle stesse si reperisce endometriosi.

Evers [40] ha riassunto i meccanismi biologici che possono impedire o favorire questa malattia, dal momento che, nel corso della mestruazione, frammenti vitali di endometrio superficiale o funzionale si staccano dall'endometrio basale - forse ad opera di una metalloproteinasi o dell'azione del TNF- α che induce la morte cellulare (apoptosi) - e vengono espulsi insieme al normale sangue mestruale. Parte di questi frammenti possono passare per via retrograda nel lume tubarico e da qui raggiungere il peritoneo e gli organi pelvici. Il fatto che, solo una piccola percentuale di quell'80-90% di donne, nelle quali si verifica la mestruazione retrograda, vada incontro alla malattia, può dipendere dall'equilibrio che nella cavità pelvica esiste, tra fattore di difesa contro l'impianto dell'endometrio (ad esempio, macrofagi attivati, cellule NK) e la possibilità per i frammenti endometriali di aderire, non tanto alla superficie del peritoneo, quanto alla matrice extracellulare sottoperitoneale, il che può avvenire solo in seguito a microtraumi verificatisi sulla sierosa del peritoneo.

- Ruolo dell'immunità umorale

Tutti gli studi che negli ultimi 20 anni si sono occupati delle modificazioni dell'immunità umorale nelle pazienti con endometriosi, hanno mostrato un'alterazione dell'attività dei linfociti B ed un'alta incidenza di autoanticorpi legata probabilmente alla elevata antigenicità degli impianti di endometrio ectopico. *Startseva* [41] ha osservato un incremento della funzione dei linfociti B in donne con endometriosi e adenomiosi, mentre *Weed e Arquembourg* [42] hanno riscontrato, sempre in donne affette da endometriosi, una diminuzione dei depositi endometriali di C3 e IgG, con una corrispondente riduzione dei livelli sierici del complemento. Sono stati osservati, inoltre, autoanticorpi (IgG ed IgA) diretti contro tessuto endometriale ed ovarico nel siero e nelle secrezioni cervicali e vaginali di pazienti con endometriosi.

Si ritiene, in ultima analisi, che la presenza di un microambiente peritoneale anormale sia una condizione “permissiva” per l'impianto e la crescita di endometrio refluito. La quantità e la qualità delle cellule endometriali nel fluido peritoneale, l'aumento dell'attività infiammatoria delle cellule del liquido peritoneale, l'incremento dell'adesione peritoneo-endometrio e l'angiogenesi, la ridotta “immunosorveglianza” e “clearance” di cellule endometriali, nonché l'aumentata produzione di autoanticorpi diretti contro le cellule endometriali sono considerati fino ad ora i principali fattori permissivi per lo sviluppo di lesioni endometriotiche (Tabella 2).

Tabella 2. Alterazioni immunologiche associate all'endometriosi.

Alterazioni sistemiche	Alterazioni peritoneali
Aumento della produzione di Ig	Proliferazione delle cellule dello stroma endometriale
Aumento della presenza di cellule T CD4 helper	Aumento della citotossicità dei macrofagi peritoneali
Diminuzione della citotossicità linfocito-mediata contro l'endometrio	Proliferazione dei linfociti
Embriotossicità del siero	Aumento del livello di citochine
Soppressione dell'attività delle cellule NK	Accentuati cicli di attivazione dei macrofagi
Diminuzione dell'immunità cellulare	Presenza di anticorpi anti-endometrio
Anormale funzione auto-immune	Diminuzione dell'attività NK dei linfociti
Diminuita attività delle cellule suppressor	Secrezione da parte dei macrofagi peritoneali di antagonisti per il recettore di IL-1

- Citochine

Le citochine giocano un ruolo importante nell'inizio, nella propagazione e nella regolazione delle risposte immuni ed infiammatorie. L'attivazione del sistema immunitario produce una cascata di citochine con attività pleiotropica e ridondante, che culmina con il reclutamento di numerosi tipi di cellule nel sito di infiammazione.

Diversi studi in letteratura hanno evidenziato l'aumento, in particolare nel fluido peritoneale di pazienti affette da endometriosi, di numerose citochine, quali: interleuchine IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, interferon- γ , TFN- α (Tumor Necrosis Factor), RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth

Factor) [43-55]. Queste citochine possono regolare l'azione dei leucociti o agire direttamente sull'endometrio eutopico, su cui possono esplicare varie funzioni coinvolte nella patogenesi e nella patofisiologia dell'endometriosi.

L'aumento dei livelli di citochine, nel fluido peritoneale di pazienti affette da questa malattia, riflette un'aumentata sintesi delle stesse da parte dei macrofagi peritoneali, dei linfociti, degli impianti di endometrio ectopico o delle cellule mesoteliali, tutte in grado di produrre tali molecole.

Comunque, i macrofagi restano la fonte principale nella produzione di citochine; i fattori chemotattici, come per esempio la MCP-1, la RANTES e l'IL-8, facilitano il reclutamento dei macrofagi nella cavità peritoneale [56].

Anche i linfociti T sono implicati nella patogenesi dell'endometriosi. Le cellule T-helper possono essere classificate in due sottoclassi: il tipo 1 (Th1) ed il tipo 2 (Th2). Le cellule Th1 producono IL-2, IL-12 e Interferon- γ , che sono potenti induttori dell'immunità cellulo-mediata. Le cellule Th2 producono soprattutto IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, che sono coinvolte nella soppressione dell'immunità cellulo-mediata. *Hsu et al.* [44] hanno studiato l'espressione delle citochine prodotte rispettivamente dalle cellule Th1 (IL-2 e Interferon- γ) e dalle cellule Th2 (IL-4 e IL-10), in monociti di sangue periferico e nel fluido peritoneale di donne con endometriosi, dimostrando che la secrezione di citochine da parte delle due sottopopolazioni di linfociti T è alterata in pazienti con malattia. La diminuzione del rapporto Th1/Th2, a favore dunque delle

cellule Th2, contribuirebbe inoltre allo sconvolgimento del meccanismo di difesa immunologico nella patologia endometriosa [56].

Recenti studi suggeriscono che anche gli impianti endometriotici producono citochine [57]. L' IL-6 viene secreta da molti tipi di cellule, tra cui cellule epiteliali endoteliali [58], macrofagi (la fonte principale di IL-6 nel fluido peritoneale) e altri leucociti [50]. Più recentemente, *Tsuda et al.* [59] hanno dimostrato che le cellule endometriosiche esprimono costitutivamente l'mRNA dell'IL-6 e producono la proteina IL-6; inoltre, questi autori hanno rilevato che, aggiungendo TNF- α alle cellule in coltura, viene stimolata la trascrizione del gene che codifica per l'IL-6, e la produzione della stessa proteina aumenta in maniera dose-dipendente. Inoltre, questi autori, confrontando la produzione di IL-6 da parte dei macrofagi e delle cellule stromali endometriosiche, in donne con endometriosi, hanno dimostrato che livelli simili di IL-6 potevano essere prodotti sia da cellule stromali derivanti da un endometrioma, che da macrofagi in condizioni basali o sotto stimolazione con TNF- α . Questi dati suggeriscono che il tessuto endometriosico può essere un'altra importante fonte di questa citochina [59].

Lo stesso TNF- α sarebbe poi in grado di indurre la produzione di interleuchine, soprattutto di IL-8 e di stimolare l'adesione delle cellule endometriali, inducendo l'espressione di metalloproteinasi (MMPs) [60].

L'endometriosi deriverebbe, pertanto, da una complessa attivazione del sistema immunitario, sia in termini di risposta umorale che cellulo-mediata,

che si traducono, in ultima analisi, in una diminuita citotossicità delle cellule NK verso il tessuto endometriale autologo ed eterologo, e nell'aumento dei macrofagi peritoneali e dei loro prodotti (citochine e fattori di crescita).

- Il ruolo delle cellule “Natural Killer”

Le evidenze sperimentali della ridotta citotossicità verso l'endometrio autologo/eterologo delle cellule “NK”, sia periferiche che peritoneali, in pazienti affette da endometriosi, suggeriscono un loro specifico ruolo nel processo di citolisi peritoneale e nello “scavenging system” capace di rimuovere il tessuto endometriale refluito (Figura 4). Il decremento dell'attività delle NK, in alternativa, potrebbe essere un epifenomeno successivo alla risposta infiammatoria contro l'endometrio ectopico, piuttosto che il fenomeno primitivo per lo sviluppo della malattia endometriosica. Si è notato, infatti, che diversi fattori derivati dai macrofagi, quali prostaglandine, sICAM-1 e TGF- β , potrebbero mediare la modulazione secondaria delle cellule NK [61].

Oosterlynck et al. [54] hanno dimostrato un aumento dell'attività del TGF- β nel fluido peritoneale di donne con endometriosi; questa citochina potrebbe inibire proprio l'attività delle cellule NK.

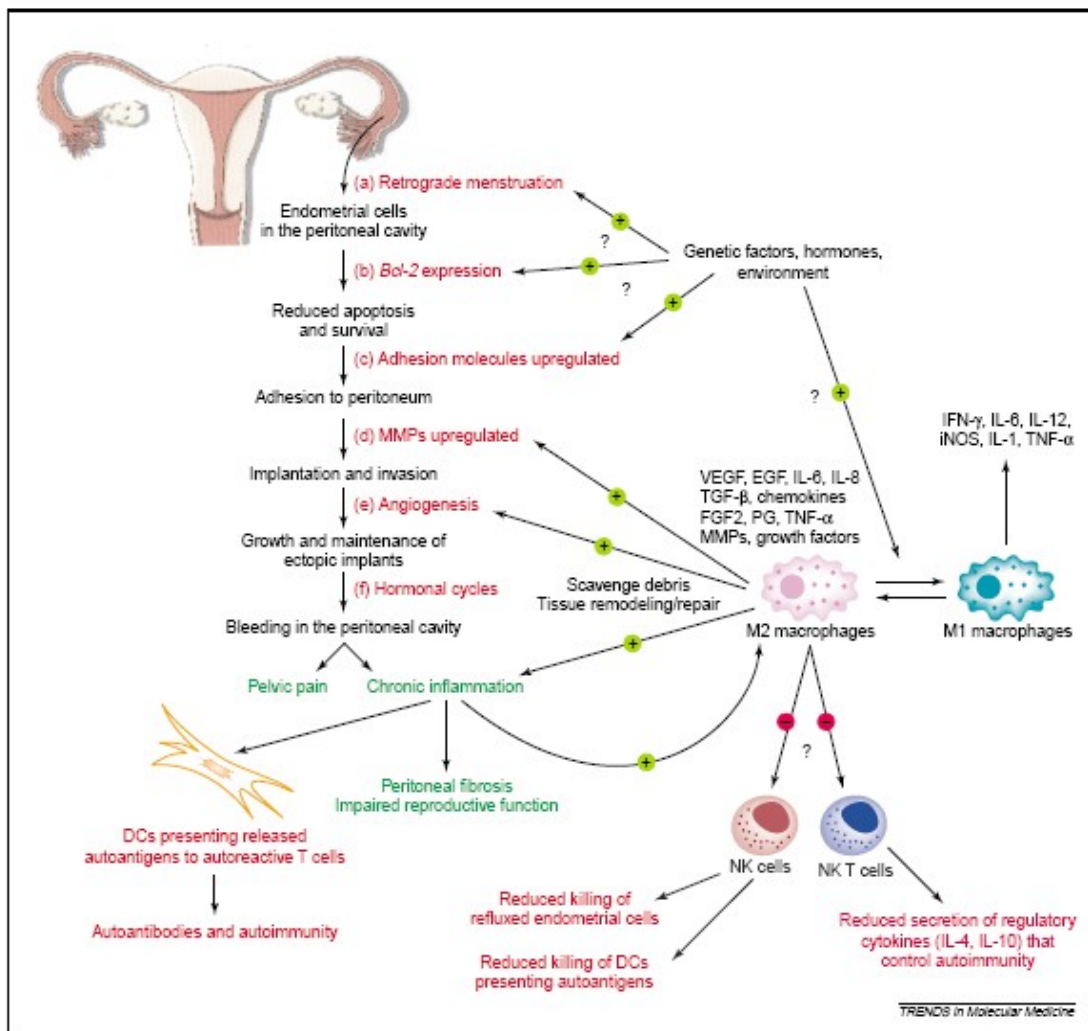


Figura 4. Fattori coinvolti nella patogenesi dell'endometriosi, con particolare enfasi sul ruolo dei macrofagi e delle cellule NK nel "killing" dell'endometrio eutopico.

- L'apoptosi nell'endometriosi

Il fenomeno dell'apoptosi, ovvero morte cellulare programmata, è implicato nella patogenesi di varie malattie e viene parzialmente regolato dal gene bcl-2, il quale blocca il processo e promuove la sopravvivenza delle cellule.

Jones et al. [62] hanno esaminato, in uno studio molto interessante, l'espressione di bcl-2 e la regolazione dei processi di apoptosi in biopsie di endometrio ectopico ed eutopico prelevato da pazienti con endometriosi ed adenomiosi, confrontandole con uno stesso numero di campioni di endometrio di controllo. L'espressione di bcl-2 nelle cellule dello stroma è apparsa incrementata nella fase secretiva del ciclo, sia nei controlli che nell'endometrio eutopico di pazienti con endometriosi, riflettendo una up-regolazione mediata dalla produzione di estrogeni in fase luteale.

L'espressione di bcl-2 nelle cellule stromali dei foci endometriotici, invece, ha mostrato un incremento statisticamente significativo, se paragonato con l'endometrio eutopico delle stesse pazienti, mostrando un ruolo preciso, quindi, nei processi di impianto e di sopravvivenza delle lesioni endometriotiche in sede ectopica [62].

Diversi altri studi hanno suggerito un decremento dei processi apoptotici e della sensibilità alla citolisi mediata dai macrofagi in lesioni endometriotiche, nonché uno specifico aumento del gene “anti-apoptotico” bcl-2 [63, 64].

- Aumento di adesione

L'adesione delle cellule endometriali esfoliate al peritoneo può condurre allo sviluppo dell'endometriosi, come proposto già nel 1994 e nel 1995 da *Van Der Linden et al.* [65, 66].

Le due principali classi di molecole di adesione coinvolte in tale processo sono le integrine e le caderine, principali mediatori dell'adesione tra cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare; la loro espressione su cellule e tessuti potrebbe essere importante per il processo iniziale di adesione del tessuto refluito. Molti studi hanno dimostrato la presenza di integrine e caderine in campioni di endometrio, di endometrio refluito e di lesioni endometriosiche. Pertanto, proprio l'abilità del tessuto ectopico refluito ad esprimere tali molecole, dopo la mestruazione retrograda, potrebbe suggerirne la potenzialità a stabilire, mediante le interazioni tra cellula e cellula e tra cellula e matrice extra-cellulare, l'adesione con il peritoneo sottostante.

Nelle lesioni endometriosiche sono espresse soprattutto le integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$. Le donne con endometriosi presentano un fluido peritoneale contenente l'integrina $\alpha 4\beta 1$, che è invece assente nelle donne senza endometriosi. Da questo, alcuni autori hanno dedotto che l'integrina $\alpha 4\beta 1$ avrebbe un ruolo potenziale nella patogenesi della malattia [67].

- Trait d'union tra sistema immune e sistema riproduttivo: endometriosi e infertilità

L'endometriosi pelvica frequentemente si associa ad infertilità, anche quando le donne affette ovulano ed hanno tube funzionali. *Strathy et al.* [68] hanno dimostrato che il 20-25% delle donne infertili presentavano endometriosi, rispetto al 2-5% delle donne che si sottoponevano a legatura delle tube (molte delle quali avevano una fertilità provata). Anche negli stadi più precoci, prima che si stabiliscano sindromi aderenziali o sovvertimento della normale anatomia, l'endometriosi si associa ad infertilità. L'esatto meccanismo attraverso il quale questa patologia interferisce con la fertilità non è ancora completamente noto, anche se molteplici cause sono state suggerite.

Molti studi hanno ipotizzato che la disfunzione ovulatoria contribuisce all'infertilità in pazienti con endometriosi minima [69]. È stata, inoltre, descritta un'associazione tra endometriosi e LUF (Luteinized Unruptured Follicle) Syndrome [70]; in quest'ultima condizione, le concentrazioni di ormoni steroidei nel fluido peritoneale risultano essere molto minori dopo un ciclo ovulatorio [71]. È stato proposto che questo ambiente a basso regime steroideo può facilitare lo sviluppo di endometriosi. Iperprolattinemia e difetti della fase luteale sono anch'essi stati proposti come possibili cause di subfertilità nell'endometriosi [72, 73].

Anche lo sviluppo follicolare può essere indebolito in pazienti con endometriosi: è stato, infatti, dimostrato in queste pazienti un difetto nella

steroidogenesi delle cellule della granulosa, che può interferire con la funzione ovocitaria e spiegare il ridotto tasso di fertilizzazione [74]. Almeno due studi hanno dimostrato un ridotto tasso di gravidanza in cicli di IVF in donne con endometriosi minima o moderata [75, 76]. Le ragioni proposte per questa riduzione sono state la diminuzione della qualità ovocitaria [75] e i difetti nell'impianto [76].

Gleicher et al. [77] hanno proposto un'associazione tra endometriosi e disordini autoimmuni; questi autori hanno notato, infatti, che il 40-60% di donne affette da tale malattia mostravano titoli aumentati di autoanticorpi (anti-fosfolipidi, anti-RNA, anti-double-strand DNA). Gli autoanticorpi possono interferire con la funzione riproduttiva in vari momenti, quali la funzione degli spermatozoi, la fertilizzazione e, più in generale, con il normale sviluppo della gravidanza [77].

Il fluido peritoneale contiene molti tipi di cellule, tra cui i macrofagi, capaci di fagocitare detriti cellulari, compreso lo sperma, nella pelvi.

Muscato et al. [78] hanno dimostrato, infatti, che i macrofagi peritoneali fagocitano lo sperma in vitro e che, in particolare, macrofagi provenienti da donne affette da endometriosi sono più attivi di quelli presenti in controlli sani.

In tal senso i macrofagi, seguendo il flusso del liquido peritoneale attraverso le tube, sino a bagnare l'endometrio uterino, potrebbero esercitare direttamente effetti deleteri sugli spermatozoi e sulla loro interazione con l'ovocita.

L'enorme varietà di sostanze ad azione autocrina e paracrina (citochine proinfiammatorie e fattori di crescita) prodotte dai macrofagi, coinvolte sia nello sviluppo che nella progressione della malattia endometriosica, potrebbero avere un ruolo fondamentale anche nel determinismo di uno stato di subinfertilità/infertilità. Diversi studi hanno, infatti, documentato un incremento di numerose citochine nel liquido peritoneale (IL-1; IL-2; IL-6; IL-8; IL-10; RANTES) di pazienti endometriosiche infertili rispetto ai controlli [79].

Ad oggi, si ritiene che siano proprio queste piccole molecole ad azione pleiotropica a rappresentare il *trait d'union* fra il sistema immune e quello riproduttivo, automantenendo il processo infiammatorio intraperitoneale e stimolando contemporaneamente la proliferazione e la neoangiogenesi del tessuto endometriale ectopico.

Sebbene i macrofagi costituiscano la sorgente principale di citochine presenti nel liquido peritoneale, tuttavia è noto che queste vengano prodotte anche da linfociti, da cellule mesoteliali peritoneali e da cellule endometriali di impianti ectopici, particolarmente di quelli più attivi (lesioni rosse), tipici di stadi precoci e più lievi di endometriosi [59].

Macrofagi attivati, citochine, fattori di crescita ed autoanticorpi in elevate concentrazioni rappresenterebbero dunque le componenti che, veicolate dal liquido peritoneale di pazienti endometriosiche, interferirebbero con le diverse fasi del meccanismo riproduttivo. Il liquido peritoneale, infatti, è a

contatto diretto con le ovaie e le tube, potendo ostacolare quindi l'ovulazione, la captazione dell'ovocita e la stessa motilità tubarica (Figura 5) [56].

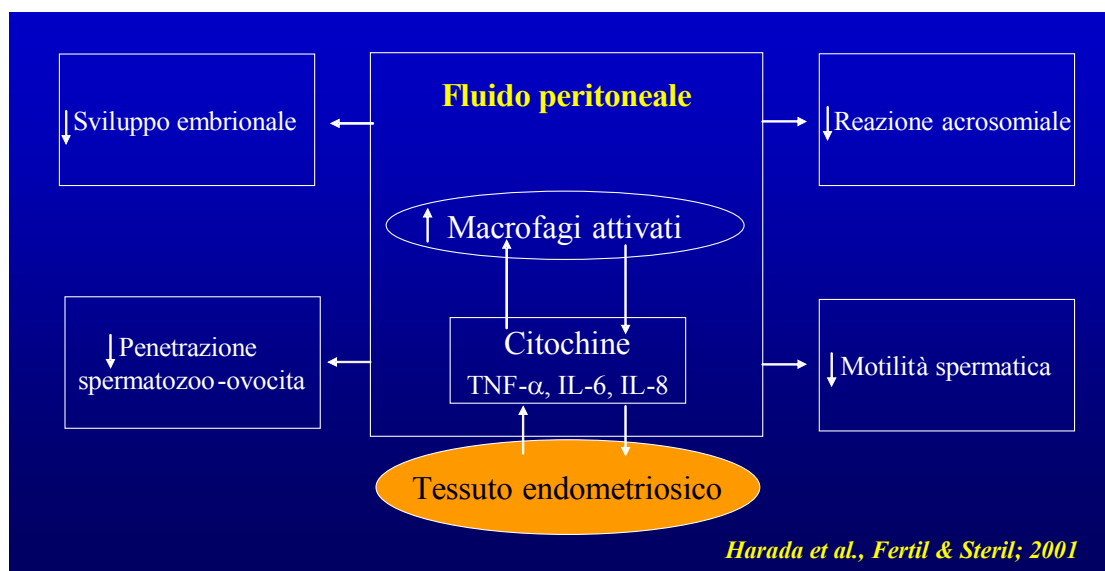


Figura 5. Ruolo del fluido peritoneale e delle citochine nella patofisiologia dell'infertilità associata ad endometriosi.

2.7 SCOPO DELLO STUDIO

a – Potenziale invasivo delle cellule endometriali di pazienti endometriosiche

L'obiettivo del nostro studio è stato la valutazione dell'espressione e del contenuto del VEGF, dell'Ang-1 e -2 e delle MMP-1, -2 e -9 nell'endometrio eutopico, nelle capsule di cisti endometriosiche e nel peritoneo di pazienti affette da endometriosi, per valutare il ruolo patogenetico di queste molecole nell'impianto di cellule endometriosiche.

La nostra ricerca nasce dall'idea che i meccanismi patogenetici alla base della formazione delle lesioni peritoneali e quelli che sottendono la formazione degli endometriomi ovarici siano indipendenti tra loro, ovvero che non necessariamente le localizzazioni a livello del peritoneo si sviluppino a seguito di quelle ovariche. È noto, infatti, che spesso si possono evidenziare spots a livello del peritoneo parietale o del cavo del Douglas prima della formazione di un endometrioma.

2.8 MATERIALI E METODI

Dal Gennaio 2007 abbiamo valutato tutte le pazienti afferenti agli ambulatori di ginecologia e di sterilità del nostro Dipartimento con diagnosi presuntiva (effettuata mediante USG) di endometrioma ovarico, sottoposte a chirurgia laparoscopica e con diagnosi confermata mediante esame istologico del pezzo operatorio.

Abbiamo innanzitutto definito i criteri di inclusione delle pazienti ed i tipi di campioni da ottenere, su cui effettuare le nostre valutazioni. Sono state incluse nello studio, previo consenso informato, pazienti in età fertile, non sottoposte nei tre mesi precedenti ad alcun trattamento farmacologico capace di interferire con il sistema immunitario o con la fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi; inoltre, queste stesse pazienti sono state sottoposte a chirurgia laparoscopica in seguito a diagnosi presuntiva effettuata con ecografia pelvica di endometrioma ovarico, poi confermata successivamente con esame istologico del pezzo operatorio.

Delle 45 pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione del nostro studio, nel periodo Gennaio 2007-Aprile 2008, 18 hanno acconsentito a partecipare, e 10 sono state sottoposte ad asportazione di endometriomi (Figura 6) per via laparoscopica, costituendo il nostro gruppo di studio.



Figura 6. Endometrioma.

I campioni ottenuti sono stati: frammenti di peritoneo e di capsule di cisti endometriosiche con le corrispondenti biopsie di endometrio eutopico, prelevato dalla cavità uterina, mediante curette di Novak al termine dell'intervento chirurgico.

Abbiamo utilizzato, inoltre, nella seconda parte del nostro studio, un gruppo di controllo costituito da 10 pazienti in età fertile sottoposte a chirurgia laparoscopica per cisti ovariche di natura benigna, non endometriosica, dalle quali abbiamo ottenuto biopsie di endometrio e di peritoneo.

Tutti gli interventi sono stati eseguiti durante la fase follicolare del ciclo mestruale. I frammenti delle cisti endometriosiche, del peritoneo e le biopsie di endometrio eutopico sono tutti stati suddivisi in due campioni: il primo è stato fissato immediatamente in formaldeide al 4% e quindi incluso in paraffina per essere processato con metodiche immunoistochimiche, il secondo è stato subito congelato a -80°C per l'analisi dell'espressione dell'mRNA attraverso RT-PCR.

IMMUNOISTOCHIMICA

- Anticorpi

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali e policlonali come antisieri primari: rabbit anti-VEGF 1:100 (Sigma, St. Louis, MO), goat anti-ANGPT1 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-ANGPT2 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-MMP-1 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), human anti-MMP-2 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA). Anticorpi “goat anti-mouse IgG” (Becton & Dickinson, Milan, Italy) e “goat anti-rabbit IgG” biotinilati (Calbiochem, Milan, Italy) sono stati utilizzati come antisieri secondari, alla diluizione di 1:200 e 1:20.000, rispettivamente. Un complesso (avidina-biotina-perossidasi) (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA) è stato utilizzato per rilevare i complessi antigene-anticorpo.

- Metodo immunoenzimatico

Dopo la sparaffinatura, le sezioni ottenute sono state fissate con acetone (4°C) per 10 minuti. La perossidasi endogena è stata inibita da perossido di idrogeno allo 0,3% in soluzione salina phosphate-buffered (PBS) per 30 minuti. Sezioni di tessuto mammario e di tessuto cerebrale sono stati processati alla stessa maniera ed utilizzati quali controlli positivi. Le sezioni sono state quindi sciacquate 3 volte in PBS al pH di 7.3 per 5 minuti ed incubate per 10

minuti con NGS (normal goat serum) alla diluizione di 1:20 e poi tutta la notte a temperatura ambiente con gli antisieri primari. Sezioni di controlli negativi sono state incubate con NRS (normal rabbit serum), mentre antisieri non correlati, quali anticorpi monoclonali di topo anti-insulina 1:1.500 (Sigma, St. Louis, MO) ed anticorpi policlonali di coniglio anti-glucagone 1:3.000 (Chemicon, Milano, Italia) sono stati utilizzati per colorare tessuto pancreatico come controlli positivi della reazione immunoenzimatica.

Per rilevare enzimaticamente gli antigeni è stato utilizzato un enhancement di Nickel solfato con cromogeno di-amino-benzidina (DAB) in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) allo 0,03%. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina.

ANALISI COMPUTERIZZATA DI IMMAGINE

Un software avanzato per analisi di immagini (Quantimet 520, Leica, Germany) è stato utilizzato per quantificare l'immunopositività delle sezioni. Le immagini sono state acquisite direttamente mediante un microscopio ottico Leitz Axiophot (Leitz, Germany) con un ingrandimento a 20X utilizzando una video-camera specializzata (DC 200, Leica, Germany). Le aree istologiche esaminate di ogni sezione sono state acquisite e successivamente processate. La qualità ottica di tali aree è stata ottimizzata modificando la luminosità ed il contrasto. Le aree immunoreattive sono state evidenziate e quindi quantificate dal programma sulla base dei loro livelli di grigio. La superficie occupata dagli

antigeni è stata espressa come percentuale di aree positive per la specifica reazione immunoistochimica rispetto all'area totale esaminata (pixels positivi/pixels totali). Questa misurazione è stata realizzata su 5 sezioni per ciascuna biopsia e sono stati analizzati 6 campi per sezione. È stato calcolato il valore medio della concentrazione degli antigeni derivato dall'analisi di tutte le aree nelle 5 sezioni. Le sezioni sono state esaminate ed acquisite da 3 osservatori indipendenti, all'oscuro del trattamento e dello stato ormonale delle pazienti.

RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION)

SEMIQUANTITATIVA

Abbiamo utilizzato la RT-PCR per analizzare l'espressione del gene target. L'RNA totale è stato isolato lisando i campioni congelati (150-300mg) in soluzione di Trizol (Life Technologies, GIBCO BRL) in accordo con il protocollo della casa produttrice. L'RNA è stato precipitato e quantificato mediante spettroscopia. Una quantità pari a 2 mg per ogni campione è stato retrotrascritto utilizzando il First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Il cDNA ottenuto da ciascun campione è stato utilizzato per la successiva amplificazione attraverso PCR con i sets di primers preparati per il gene target ed i geni housekeeping gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) e beta-actina (β -actin). L'amplificazione del gene GAPDH è stata utilizzata come

doppio controllo interno. È stato calcolato il rapporto tra i campioni ed il gene housekeeping per normalizzare le variazioni iniziali delle concentrazioni del campione e come controllo dell'efficienza della reazione. Allo scopo di prevenire inaccurately quantitative derivanti da effetti competitivi e da differenze di efficienza e di ranges di amplificazione dei cDNAs, i geni target ed i cDNAs GAPDH generati dalla stessa reazione di retrotrascrizione sono stati amplificati in provette separate contenenti volumi crescenti della reazione di retrotrascrizione (1, 2, 4 e 8 μ l), per documentare l'amplificazione in una regione lineare per ciascun cDNA. Le sequenze dei primers sono state disegnate utilizzando il software Primer 3 (sviluppato da Steve Rozen and Helen J Skaletsky) disponibile on-line su <http://www-genome.wi.mit.edu>. La PCR semiquantitativa (PCR) è stata effettuata in un volume totale di 50 μ l. È stato importante selezionare un appropriato numero di cicli di amplificazione in modo tale che il prodotto fosse chiaramente visibile su gel di agarosio e potesse essere quantificato, ma anche affinché l'amplificazione avvenisse in un range esponenziale e non raggiungesse un plateau di saturazione. Il numero ottimale di cicli è rientrato nello stesso range per lo specifico RNA di interesse. Quando la temperatura di appaiamento dei due sets di primers è risultata differente, modificando le stesse temperature di appaiamento è stata testata ed ottenuta la temperatura ottimale per ogni set di primer. La miscela di reazione conteneva 3 μ l of cDNA, 10-20 pmol di ogni primer, 200 mM per ogni dNTP, 1.5 mM MgCl₂ e 1 unità di Taq polimerasi con la soluzione

provvista dal kit. L'amplificazione è stata effettuata in un Techgene Thermal Cycler (Techgene, Krackler Scientific Inc., USA) alle seguenti condizioni: 95°, 5 minuti di iniziale fase di denaturazione; 95° C, 1 minuto; 55° C, 1 minuto; 72° C, 1 minuto per 18-24 cicli; 72° C, 10 minuti, estensione finale. In ciascun esperimento, la possibile contaminazione del DNA è stata determinata da una reazione di controllo, in cui il cDNA è stato omesso dalla miscela di reazione e sostituito da acqua priva di contaminazione da parte di acidi nucleici (DNA ed RNA). I prodotti amplificati (12 µl di ogni campione) sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro, fotografato poi sotto illuminazione con luce ultravioletta. I livelli di RNA trascritto sono stati stimati mediante un metodo densitometrico e normalizzati con i controlli. Le analisi densitometriche dei prodotti PCR sono state effettuate utilizzando il software di immagini ImageJ v1.29 (prodotto da Wayne Rasband) disponibile on-line su <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. I valori densitometrici dei prodotti PCR generati da volumi crescenti di reazione di retrotrascrizione sono stati rapportati al prodotto dei segnali del gene target e dei geni GAPDH e β -actine per ciascun campione (unità densitometriche/µl di reazione di ratrotrascrizione). I dati sono stati espressi con la media \pm SD. Tutti i prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il kit di purificazione QIAquick PCR (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) e sono stati controllati mediante un sequenziamento automatico di DNA su entrambi i filamenti utilizzando una

reazione chimica di analisi di sequenza con il sequenziatore Applied biosystem Model 373° DNA.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Statistical Package for Social Science (SPSS, versione 10.0). Per stimare la distribuzione dei dati è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilks e tutte le variabili hanno mostrato una distribuzione normale. Per valutare le differenze nei livelli (con immunoistochimica) e nell'espressione (con RT-PCR) di VEGF, Ang-1, Ang-2, MMP-1, MMP-2 e MMP-9 tra il tessuto delle cisti, il tessuto endometriale ed il peritoneo della stessa paziente è stato utilizzato il test *t* di Student per dati appaiati; mentre il test *t* di Student per dati non appaiati è stato utilizzato per valutare le differenze tra i soggetti affetti da endometriosi (gruppo di studio) e i controlli.

2.9 RISULTATI

Non si sono evidenziate differenze circa l'età e il BMI nei due gruppi di studio. Tutte le pazienti del gruppo di studio sono state assegnate, in numero di 7 allo stadio III, e in numero di 3 allo stadio IV di estensione della malattia endometriosica, secondo la *Revised-American Fertility Society Classification* [80] (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche delle pazienti. I valori sono mostrati come media \pm DS.

Variabile	Gruppo di Studio (n = 10)	Gruppo di controllo (n = 10)
Età (anni)	30.4 \pm 12.6	31.5 \pm 13.1
BMI (kg/m ²)	23.4 \pm 3.2	23.7 \pm 2.5
Stadio endometriosi*		
Stadio I	0	-
Stadio II	0	-
Stadio III	7	-
Stadio IV	3	-

* In accordo con la classificazione r-AFS (revised-American Fertility Society).

I risultati delle analisi immunoistochimica e di biologia molecolare, sono riportati nelle tabelle 4-6 e nelle figure 7-9.

Nel gruppo di studio, l'analisi immunoistochimica ha mostrato una concentrazione significativamente maggiore ($p < 0.001$) di VEGF e Ang-1 nelle cisti endometriosiche rispetto all'endometrio eutopico, mentre non sono

risultate essere significative le differenze nei valori di Ang-2, MMP-1, -2 e -9 (Tabella 4).

La concentrazione di VEGF, Ang-1 e -2, inoltre, è risultata significativamente più alta ($p<0.001$) nelle cisti endometriosiche rispetto al peritoneo nel gruppo di studio, mentre non si è rilevata alcuna differenza statisticamente significativa in questi due gruppi, per quanto riguarda le MMP-1, -2 e -9 (Tabella 4).

In aggiunta, nel gruppo di studio, i livelli di VEGF, Ang-1 e -2 risultano essere significativamente aumentati ($p<0.001$) nell'endometrio eutopico rispetto al peritoneo; nessuna differenza è stata riscontrata per quanto concerne le MMPs (Tabella 4).

Infine, le concentrazioni di VEGF, Ang-1 e -2, MMP -1, -2 e -9 sono apparse significativamente aumentate ($p<0.001$) nell'endometrio eutopico del gruppo di studio rispetto all'endometrio del gruppo di controllo (Tabella 5), e nel peritoneo delle pazienti affette rispetto a quelle sane (Tabella 6).

Tabella 4. Valori medi espressi in O.D. (optical density) rilevati sui campioni di cisti endometriosiche, endometrio eutopico e peritoneo del gruppo di studio, con metodica immunoistochimica.

	VEGF	Ang-1	Ang-2	MMP-1	MMP-2	MMP-9
Cisti	1.82±0.15	1.64±0.15	1.60±0.15	1.50±0.20	1.54±0.08	1.86±0.07
Endometrio	1.59±0.16 (*§)	1.46±0.22 (*§)	1.50±0.18 (§)	1.42±0.18	1.47±0.10	1.88±0.09
Peritoneo	1.33±0.14 (*)	1.26±0.11 (*)	1.34±0.10 (*)	1.42±0.17	1.50±0.11	1.82±0.10

(*) p<0.001 vs cisti

(§) p<0.001 vs peritoneo

Tabella 5. Valori medi, espressi in O.D. (optical density), rilevati sui campioni di endometrio del gruppo di studio e di quello di controllo, con metodica immunoistochimica.

	Pazienti (*)	Controlli
VEGF	1.82±0.15	0.65±0.17
Ang-1	1.46±0.22	0.80±0.09
Ang-2	1.50±0.18	0.60±0.12
MMP-1	1.41±0.17	0.58±0.10
MMP-2	1.47±0.09	0.71±0.13
MMP-9	1.88±0.09	0.76±0.16

(*) p<0.001 vs controllo per tutte le variabili

Tabella 6. Valori medi, espressi in O.D. (optical density), rilevati sui campioni di peritoneo del gruppo di studio e di quello di controllo, con metodica immunoistochimica.

	Pazienti (*)	Controlli
VEGF	1.33±0.15	0.71±0.06
Ang-1	1.26±0.11	0.62±0.17
Ang-2	1.34±0.10	0.64±0.11
MMP-1	1.42±0.17	0.63±0.13
MMP-2	1.50±0.11	0.63±0.14
MMP-9	1.83±0.11	0.74±0.13

(*) p<0.001 vs controllo per tutte le variabili

I risultati dell'analisi dei dati ottenuti tramite RT-PCR (Figure 7-9), sono sovrapponibili a quelli ottenuti mediante tecnica immunoistochimica (Figure 10-12).

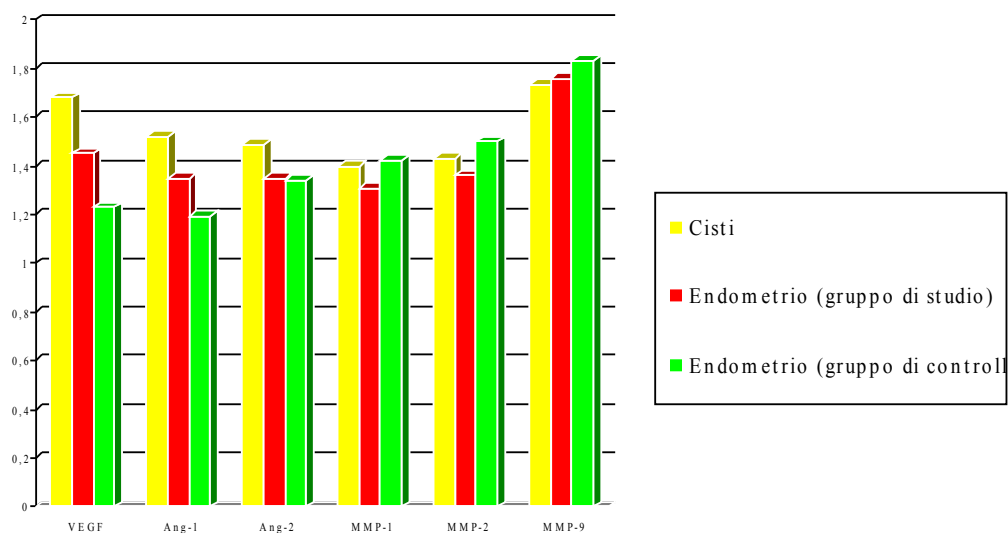


Figura 7. Espressione (valutata con RT-PCR) di VEGF, Ang-1, Ang-2, MMP-1, MMP-2, MMP-9 misurata nelle cisti endometrioidiche, nell'endometrio del gruppo di studio e nell'endometrio del gruppo di controllo.

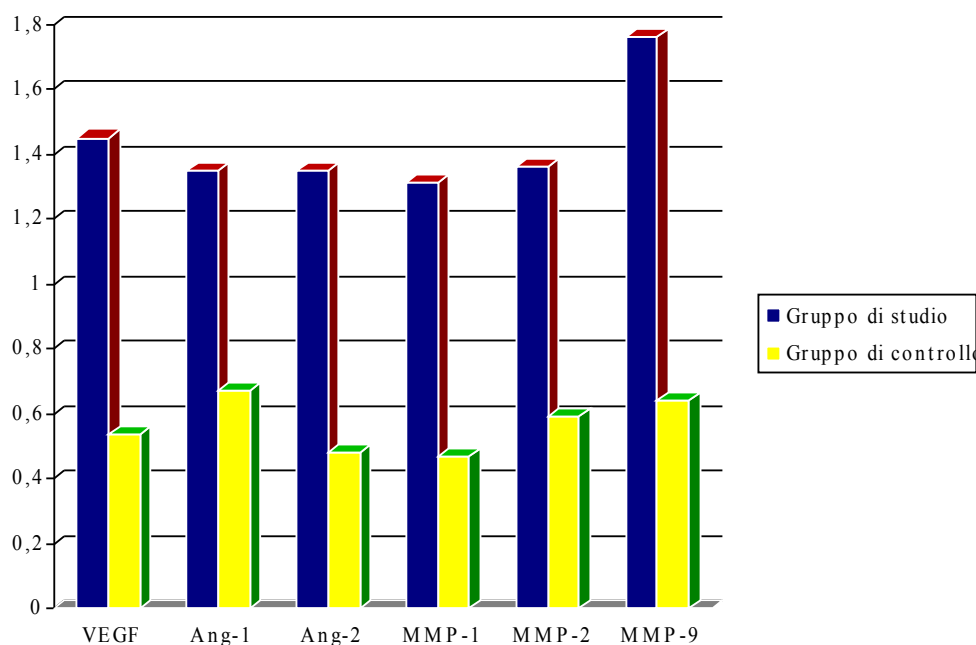


Figura 8. Espressione (valutata mediante RT-PCR) di VEGF, Ang-1, Ang-2, MMP-1, MMP-2, MMP-9 misurata nell'endometrio eutopico del gruppo di studio e di quello di controllo.

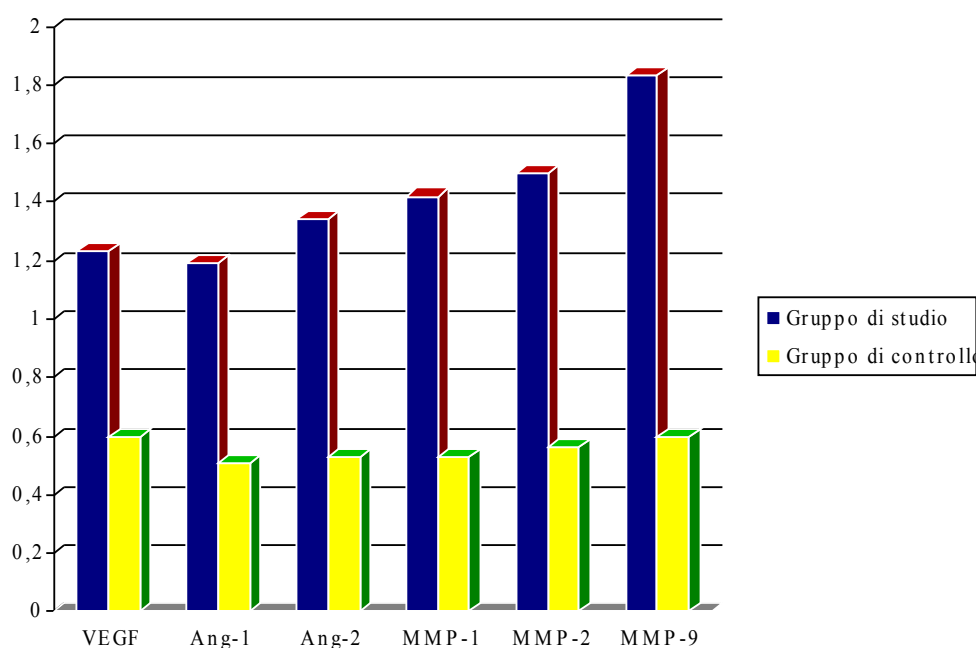


Figura 9. Espressione (valutata con RT-PCR) di VEGF, Ang-1, Ang-2, MMP-1, MMP-2, MMP-9 misurata nel peritoneo del gruppo di studio e di quello di controllo.

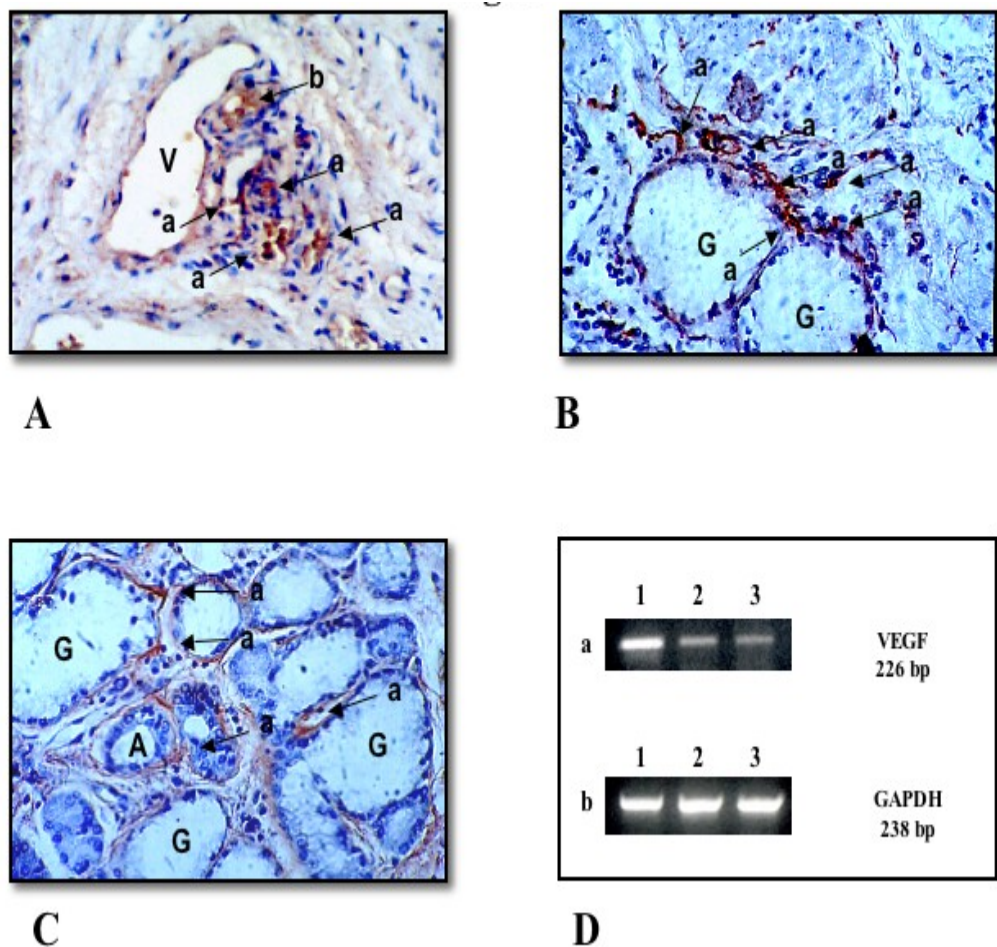


Figura 10.

A) Immunolocalizzazione di VEGF (Vascular endothelial growth factor) nelle cisti delle pazienti del gruppo di studio: (a) cellule stromali e fibre. (b) cellule delle pareti vasali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

B) Immunolocalizzazione di VEGF (Vascular endothelial growth factor) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di studio: (a) cellule stromali e fibre. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

C) Immunolocalizzazione di VEGF (Vascular endothelial growth factor) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di controllo: (a) cellule stromali e fibre. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

D) RT-PCR per VEGF (Vascular endothelial growth factor) (a) e GAPDH (Glyceraldehydes phosphate dehydrogenase) (b): campioni di cisti delle pazienti del gruppo di studio (1) e di endometrio delle pazienti del gruppo di studio (2) e del gruppo di controllo (3) rispettivamente.

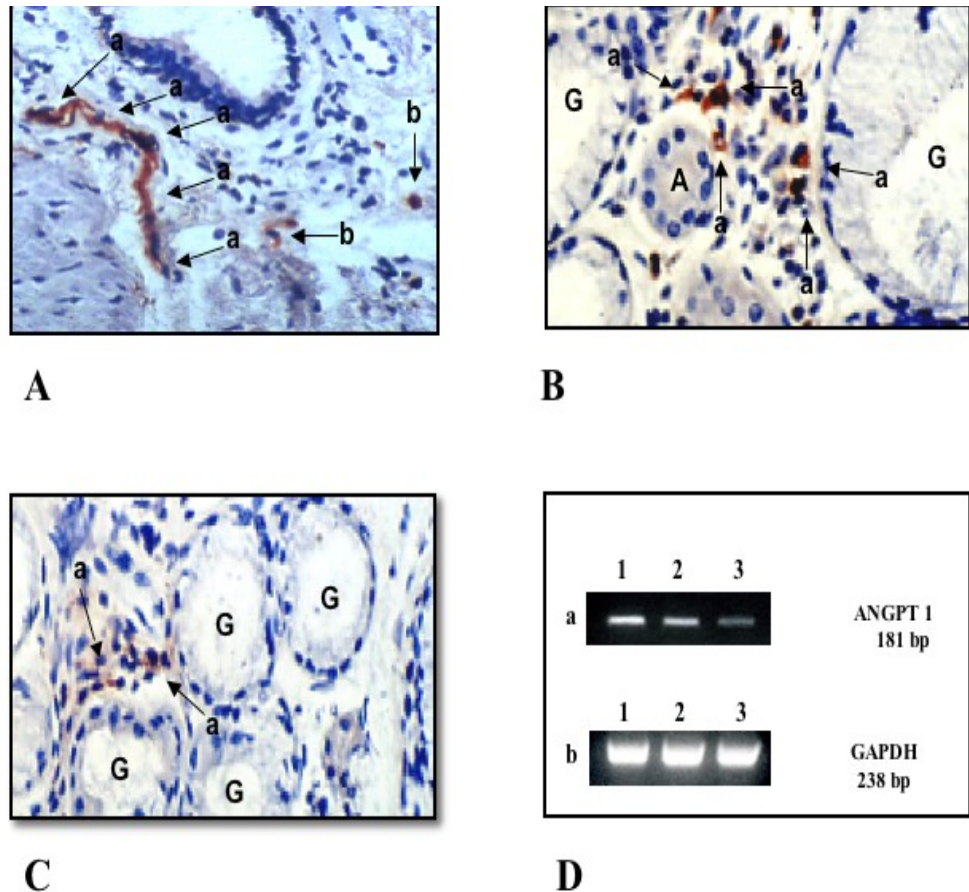


Figura 11.

A) Immunolocalizzazione di ANGPT 1 (Angiopoietin 1) nelle cisti delle pazienti del gruppo di studio: (a) fibre stromali, (b) cellule stromali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

B) Immunolocalizzazione di ANGPT 1 (Angiopoietin 1) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di studio: (a) cellule stromali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

C) Immunolocalizzazione di ANGPT 1 (Angiopoietin 1) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di controllo: (a) cellule stromali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

D) RT-PCR per ANGPT 1 (Angiopoietin 1) (a) e GAPDH (Glyceraldehydes phosphate dehydrogenase) (b): campioni di cisti delle pazienti del gruppo di studio (1) e di endometrio delle pazienti del gruppo di studio (2) e del gruppo di controllo (3) rispettivamente.

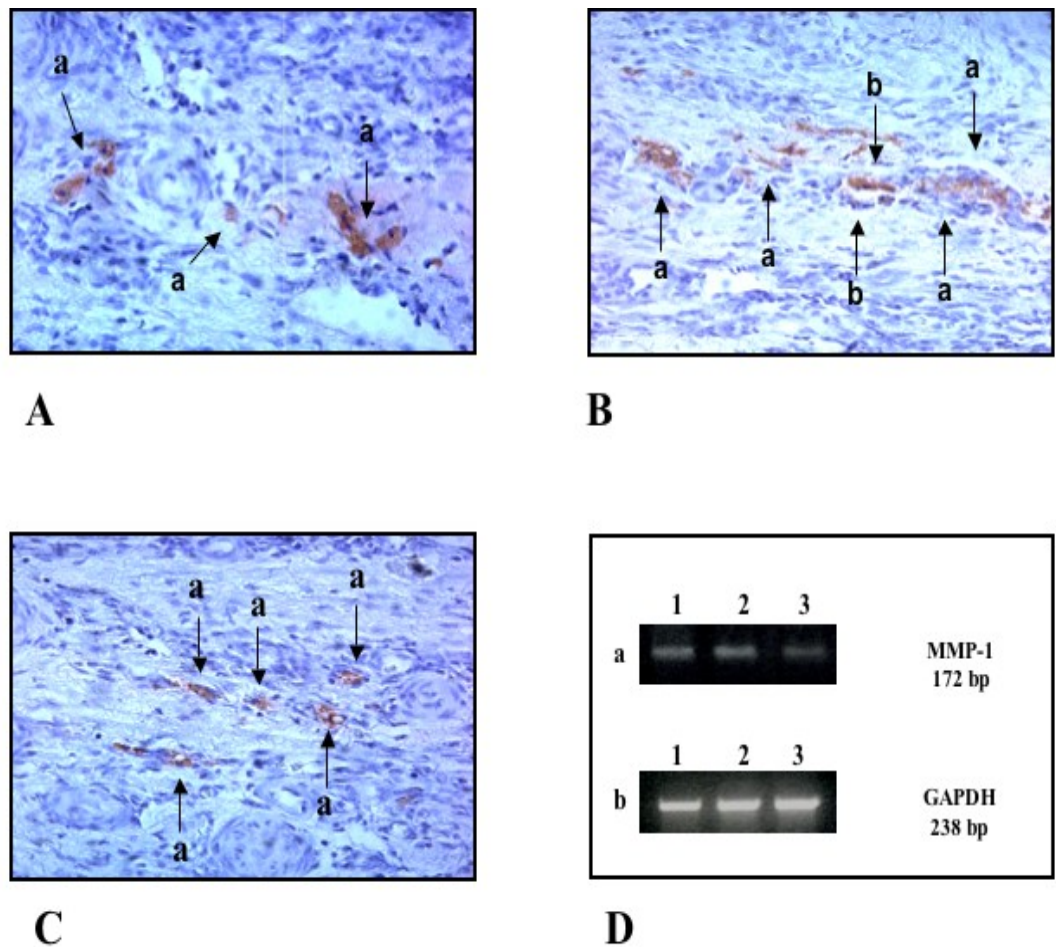


Figura 12.

A) Immunolocalizzazione di MMP-1 (Metalloproteinase 1) nelle cisti delle pazienti del gruppo di studio: (a) cellule e fibre stromali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

B) Immunolocalizzazione di MMP-1 (Metalloproteinase 1) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di studio: (a) cellule e fibre stromali, (b) vasi venosi. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

C) Immunolocalizzazione di MMP-1 (Metalloproteinase 1) nell'endometrio delle pazienti del gruppo di controllo: (a) cellule e fibre stromali. ABC/HRP method. Original magnification x 200.

D) RT-PCR per MMP-1 (Metalloproteinase 1) (a) e GAPDH (Glyceraldehydes phosphate dehydrogenase) (b): campioni di cisti delle pazienti del gruppo di studio (1) e di endometrio delle pazienti del gruppo di studio (2) e del gruppo di controllo (3) rispettivamente.

2.10 DISCUSSIONE

In uno studio preliminare [81] abbiamo confrontato l'espressione di fattori angiogenetici (VEGF, Ang-1, Ang-2) e metalloproteinasi (MMP-1, MMP-2, MMP-9), nell'endometrio eutopico ed ectopico delle pazienti affette da endometriosi. In questo studio abbiamo dimostrato che l'endometrio ectopico di suddette pazienti esprimeva una maggiore quantità di tali fattori rispetto all'endometrio eutopico.

Questi dati sembrano supportare l'ipotesi che l'endometrio eutopico delle pazienti affette da endometriosi possa essere costituzionalmente o funzionalmente diverso da quello dei soggetti non affetti, ovvero che possa aver sviluppato differenti proprietà angiogenetiche, che potrebbero essere necessarie al suo impianto in sede ectopica.

L'impianto ectopico delle cellule endometriali, refluite in cavità peritoneale durante la fase mestruale, rappresenta, infatti, una delle più accreditate teorie sull'etiopatogenesi dell'endometriosi, ma, essendo questo un fenomeno parafisiologico, è stata suggerita la presenza di vari altri meccanismi che consentirebbero l'impianto ectopico delle cellule endometriali. In accordo con la presenza di fattori immunologici locali, quali interleuchine e $\text{TNF-}\alpha$ [43], che appaiono aumentati nel fluido peritoneale, l'insorgenza e la progressione della malattia endometriosica sembra essere legata a specifiche proprietà invasive ed angiogenetiche della cellula endometriale.

Come già ampiamente dimostrato in alcuni processi fisiologici e patologici (es. invasione trofoblastica nello sviluppo embrionale, processi di crescita tumorale, etc.) la degradazione della matrice extracellulare rappresenta un passo fondamentale per l'”invasività” [40]. La formazione di neovasi, inoltre, è fondamentale per la sopravvivenza del tessuto impiantato [8, 82].

Le metalloproteinasi sono espresse normalmente nell'endometrio normale e la loro produzione risulta finemente regolata dagli steroidi sessuali durante le varie fasi del ciclo mestruale. La dimostrazione dell'espressione di alcune MMPs nelle lesioni endometriosiche e nel liquido peritoneale di pazienti affette da endometriosi, nonché la riduzione di alcuni inibitori di metalloproteinasi (TIMP-s) in lesioni endometriosiche, indicano il potenziale invasivo del tessuto endometriale ectopico [83, 84].

L'endometrio esprime costituzionalmente VEGF ed angiopoietine. L'espressione del VEGF, fondamentale per l'ovulazione e la formazione del corpo luteo [85], è stata dimostrata anche nelle lesioni endometriosiche [82]. Tale fattore di crescita avrebbe un ruolo chiave nell'impianto ectopico di cellule endometriali, promuovendo la differenziazione di cellule mesodermiche in cellule endoteliali e la regolazione della formazione di capillari tubulari.

L'angiopoietina-1, una citochina che potenzia l'effetto di altri fattori angiogenetici, nonostante sia presente nelle lesioni endometriosiche, presenta un pattern di espressione simile nelle lesioni pigmentate rispetto a quelle non pigmentate, lasciando ancora incompresa la sua esatta funzione nel processo

angiogenetico coinvolto nella patogenesi dell'endometriosi [86]. D'altra parte, esistono studi in vitro che mostrano un incremento del sistema Ang-1/Ang-2 mRNA in cellule endometriali espianate, suggerendo comunque un ruolo importante di questi fattori di crescita nella patogenesi della malattia [8].

Le cisti endometrioidiche esprimono e contengono una maggiore concentrazione sia di fattori angiogenetici che di metalloproteinasi rispetto alla loro controparte uterina. È stato ipotizzato, quindi, che il tessuto endometriale migrato in cavità peritoneale subisca modificazioni che conducono, in ultima analisi, al suo impianto ed alla neoangiogenesi. Se questi cambiamenti siano specificamente dovuti a fattori intrinseci del tessuto migrato o all'azione di sostanze presenti in cavità peritoneale, a fattori immunologici o all'ipossia presente nel microambiente peritoneale stesso, resta ancora da dimostrare. Poiché è stato dimostrato che il TNF- α , oltre che essere un potente fattore angiogenetico, stimola anche l'adesione di cellule endometriali inducendo l'espressione di metalloproteinasi, possiamo ipotizzare che l'incremento dei suoi livelli nel liquido peritoneale di pazienti con endometriosi possa indurre le cellule endometriali ectopiche ad aumentare la produzione di molecole angiogenetiche e pro-invasive [60].

È interessante, inoltre, che i risultati del nostro precedente studio [81] abbiano dimostrato che potrebbe esistere una differenza funzionale e/o costituzionale dell'endometrio delle pazienti affette, che potrebbe predisporre

allo sviluppo della malattia endometriosica, dopo la migrazione del tessuto in cavità peritoneale.

Il presente lavoro conferma i dati relativi alla differente espressione delle sopracitate molecole nell'endometrio eutopico delle donne con o senza endometriosi, ma, in aggiunta, valuta i livelli e l'espressione di questi fattori angiogenetici anche nel peritoneo di queste donne.

Abbiamo rilevato, infatti, che:

- le cisti endometriosiche contengono ed esprimono una maggiore quantità di fattori angiogenetici rispetto all'endometrio eutopico e al peritoneo della stessa paziente;
- l'endometrio eutopico delle suddette donne esprime una quantità più elevata di fattori angiogenetici, rispetto al peritoneo;
- l'espressione e il contenuto di tali fattori è maggiore nell'endometrio e nel peritoneo delle pazienti con endometriosi rispetto all'endometrio e al peritoneo delle pazienti del gruppo di controllo.

2.11 CONCLUSIONI

Con il presente studio, abbiamo voluto dimostrare che esiste un differente pattern di espressione di VEGF, Ang-1 e -2, MMP-1, -2 e -9 nel peritoneo di pazienti affette da endometriosi rispetto alle capsule degli endometriomi ovarici. Ciò supporta la nostra tesi, secondo la quale i meccanismi patogenetici alla base della formazione delle lesioni peritoneali e quelli che sottendono la formazione delle cisti endometriosiche siano indipendenti tra loro, ovvero che non necessariamente le localizzazioni a livello del peritoneo si sviluppino a seguito di quelle ovariche.

CAPITOLO 3 - SVILUPPO E PATOLOGIA DELLA PLACENTA

3.1 INTRODUZIONE

La nascita di un neonato sano a termine dipende da una serie coordinata di eventi nello sviluppo embrionale e placentare. Un'alterazione, in una o più fasi fondamentali della placentazione, può causare un'ampia gamma di complicanze gravidiche che spazia dall'aborto embrionale o morte fetale nel secondo trimestre a tre delle più importanti patologie del terzo trimestre, ovvero la pre-eclampsia, il ritardo di crescita intrauterino ed il distacco di placenta. Diversi gradi di sviluppo anomalo della placenta e processi patologici secondari sottendono queste complicanze gravidiche.

Da queste premesse è facile ipotizzare un primum movens patogenetico comune di queste patologie.

3.2 SVILUPPO DELLA PLACENTA

- Prime fasi della placentazione: il primo trimestre

La placentazione inizia con l'impianto della blastocisti al di sotto dell'epitelio endometriale e la differenziazione in tessuti embrionali e non-embrionali (Figura 13) [87]. In questa fase, l'embrioblasto è circondato da un rivestimento sinciziotrofoblastico attraverso il quale colonne di cellule citotrofoblastiche penetrano lo stroma uterino. Il citotrofoblasto che penetra oltre il rivestimento sinciziotrofoblastico assume l'aspetto del citotrofoblasto extra-villoso. Queste cellule invadono lo stroma uterino ed hanno due funzioni: 1) localizzare e circondare i rami distali della circolazione arteriosa uterina, ovvero le arterie spirali; 2) comunicare con la circolazione materna attraverso segnali endocrini per favorire il flusso ematico verso il sito di impianto e mediare le risposte materne alla gravidanza.

Le colonne più prossimali di cellule citotrofoblastiche vengono penetrate centralmente dal mesoderma extra-embrionale, nel quale si formano i vasi ematici feto-placentari per vasculogenesi. Queste strutture a tre strati sono i precursori dei villi coriali che scambiano gas e sono denominati villi terziari. Essi comprendono uno strato esterno di trofoblasto che ricopre il mesoderma ed i vasi ematici che si connettono prossimalmente con le arterie ombelicali e separano la circolazione materna e quella fetale in un assetto emocoriale. Il loro sviluppo coordinato in assi villosi maturi è fondamentale per la crescita ed

il benessere fetale nel terzo trimestre. Lo strato esterno è il trofoblasto villosi. Le colonne originali di citotrofoblasto sono inizialmente disperse in un monostrato di cellule che poggiano su di una lamina basale, che le separa dallo stroma villosi sottostante. Queste cellule sono una popolazione cellulare eterogenea denominata “citotrofoblasto villosi”. Le cellule basali producono cellule figlie che si fondono nel sinciziotrofoblasto sovrastante [88].

Nella prima fase del primo trimestre, l’epitelio placentare, o corion, è una struttura sferica che circonda completamente l’embrione e si proietta nella cavità uterina. Alla fine del primo trimestre, la crescita placentare fa sì che la camera gestazionale occupi interamente la cavità uterina (Figura 14A). Il corion si è differenziato in una placenta definitiva, o corion frondosum, che occupa circa un terzo della cavità uterina, mentre le membrane, o corion leave, ricoprono la maggior parte della camera gestazionale. Il corion frondosum contiene villi coriali allo stadio di villi terziari, connessi al feto tramite la circolazione ombelicale. Questi villi crescono continuamente e si differenziano durante tutta la gravidanza, formando la placenta matura.

La presenza di un feto vitale a 12 settimane di gestazione (Figura 14B), è quindi condizionata da una serie di specifiche azioni cellulari: la direzione del trofoblasto in due vie distinte, l’interazione del trofoblasto con i tessuti stromali di derivazione materna o fetale e la formazione de novo di vasi ematici. Le informazioni sugli eventi molecolari che controllano queste fasi derivano, almeno in parte, da studi sui topi. Delezioni geniche specifiche in

queste vie possono causare aborto in determinati periodi della gravidanza. Questa informazione può aiutarci a comprendere la patologia che molto sommariamente gli ostetrici chiamano “insufficienza placentare”.

- Invasione citotrofoblastica extravillosa

Il trofoblasto extravilloso (EVT) inizia ad invadere i tessuti materni non appena il citotrofoblasto oltrepassa il rivestimento sinciziotrofoblastico. Queste cellule invadono costantemente l'endometrio durante tutto il primo trimestre [89]. Il grado di invasione dell'EVT nelle prime fasi della gravidanza non era sospettato, dato che l'isteroscopia operativa non aveva dimostrato flusso ematico uteroplacentare prima delle 12 settimane di gestazione [90]. Lo sviluppo embrionale, quindi, si verifica in un ambiente ipossico relativamente alla madre, per cui è protetto dallo stress ossidativo. Allo stesso modo, i villi placentari precoci sono vulnerabili alle lesioni mediate dall'ossigeno [91]. Questo paradosso apparente tra l'invasione EVT precoce e la necessità di proteggere l'embrione (ed i villi placentari) dall'ossigeno viene risolto dalla natura tramite la differenziazione dell'EVT in due distinti tipi di cellule. Una parte dell'EVT prolifera all'interno delle arteriole e viene denominata “trofoblasto endovascolare”. Queste cellule occludono le arteriole spirali nella decidua in modo da evitare che il sangue materno penetri nello spazio intervilloso in via di sviluppo [92]. Il fenomeno del blocco delle arteriole è limitato al sito di impianto e, quindi, mantiene un ambiente ipossico per

l'angiogenesi fetoplacentare nei villi terziari. La formazione del corion leave è, in parte, dovuto alla regressione vascolare dei villi che vengono ossigenati dal sangue materno a causa della mancanza locale del trofoblasto endovascolare [93]. Quindi, l'attività del trofoblasto endovascolare indirizza le dimensioni ultime del piatto coriale e della placenta definitiva (Figura 15). Questa fase è cruciale per assicurare una dimensione adeguata della placenta in modo che la crescita fetale sia normale. Una volta che si è formato il disco placentare a spese delle membrane, l'occlusione delle arteriole spirali da parte del trofoblasto endovascolare non è più necessaria; ciò spiega perché il trofoblasto endovascolare non si osserva più nelle biopsie placentari nel terzo trimestre.

Al contrario, l'invasione del trofoblasto extravillioso interstiziale è maggiore e continua durante il secondo trimestre [94]. Queste cellule circondano preferenzialmente le arteriole spirali dove rimpiazzano le pareti arteriose muscolari con una matrice simil-fibrinoide per creare canali passivamente dilatati che portano il sangue agli spazi intervillosi [95]. Il terzo interno del miometrio viene invaso dall'EVT interstiziale per una profondità stimata di 3-5 mm. La profondità dell'invasione è limitata a 2 mm circa nelle gravidanze complicate da pre-eclampsia [96] e la densità dell'invasione è ridotta [97], soprattutto per apoptosi mediata dalla persistenza dei leucociti materni nella decidua che produce citochine pro-apoptotiche [98].

In genere, si ritiene che la trasformazione anatomica dei 2-3 mm distali delle arteriole spirali sia responsabile delle notevoli alterazioni delle onde flussimetriche che si osservano nel secondo trimestre. Nuove ricerche suggeriscono però che questo non è vero. Nuove tecniche flussimetriche hanno dimostrato che la maggior parte del flusso ematico uterino nel secondo trimestre non penetra negli spazi intervillosi [99]. Quindi, la maggior parte delle modifiche delle flussimetrie delle arterie uterine nel secondo trimestre sono il risultato di fistole artero-venose nell'ambito del miometrio. Da un punto di vista fisiologico, questo è plausibile dato che l'estrazione frazionale di ossigeno nelle gravidanze normali è intorno al 40% [100]. D'altro canto, questi dati implicano che l'EVT promuove il flusso dell'arteria uterina in modi diversi dall'erosione dei 3 mm distali delle arteriole spirali. La spiegazione che attualmente trova maggiori consensi è che le cellule EVT interstiziali secernino segnali angiogenetici e vasodilatanti che favoriscono non solo il flusso ematico locale, ma mediano anche l'aumento della gittata cardiaca ed il volume ematico materno e riducono la pressione ematica grazie a vasodilatazione sistemica [101]. La mancata riduzione della pressione arteriosa e della concentrazione dell'emoglobina [102] nel secondo trimestre sono segni clinici del mancato signalling alla madre e rappresentano segni precoci di IUGR e/o di pre-eclampsia [103].

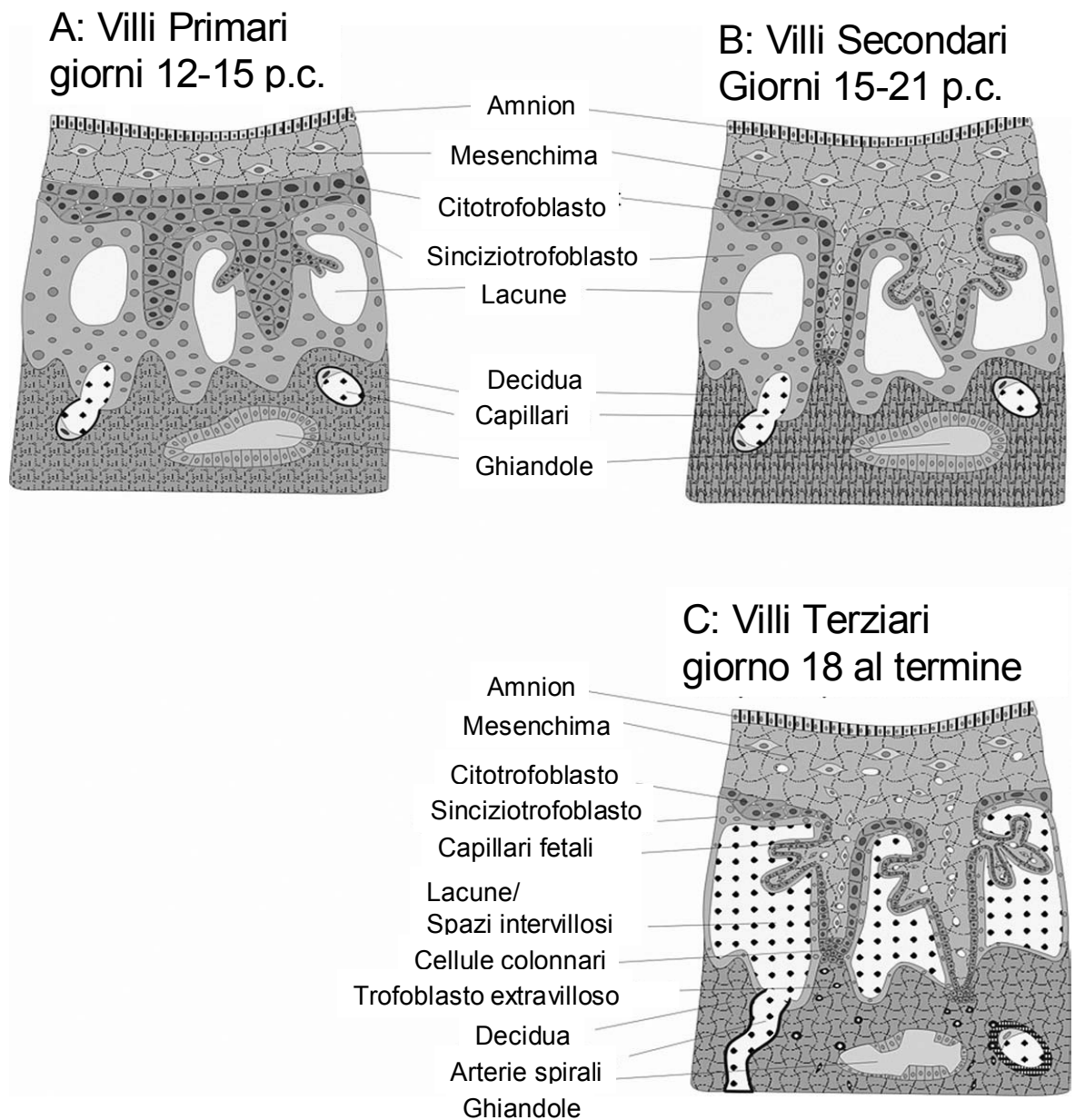


Figura 13. Eventi fondamentali nello sviluppo placentare I.

A. Tra i giorni 12-15 post-concepimento, si formano i villi primari come colonne di cellule citotrofoblastiche circondate da sincizio trofoblasto.

B. Tra i giorni 15-21, le colonne trofoblastiche vengono penetrate centralmente da mesenchima extra-embryonale con formazione dei villi secondari.

C. Ad iniziare dal 18° giorno post-concepimento, nei villi placentari si formano i vasi ematici placentari per vasculogenesi, con sviluppo dei villi terziari che formeranno l'asse villosa placentare presente sino alla fine della gravidanza.



Figura 14. Aspetto ecografico della placenta nel primo trimestre.

A. A 8 settimane di gestazione, la placenta è una struttura sferica che circonda completamente l'embrione.

B. A 12 settimane di gestazione, la placenta definitiva risulta separata dal resto del corion leave che formerà le membrane.

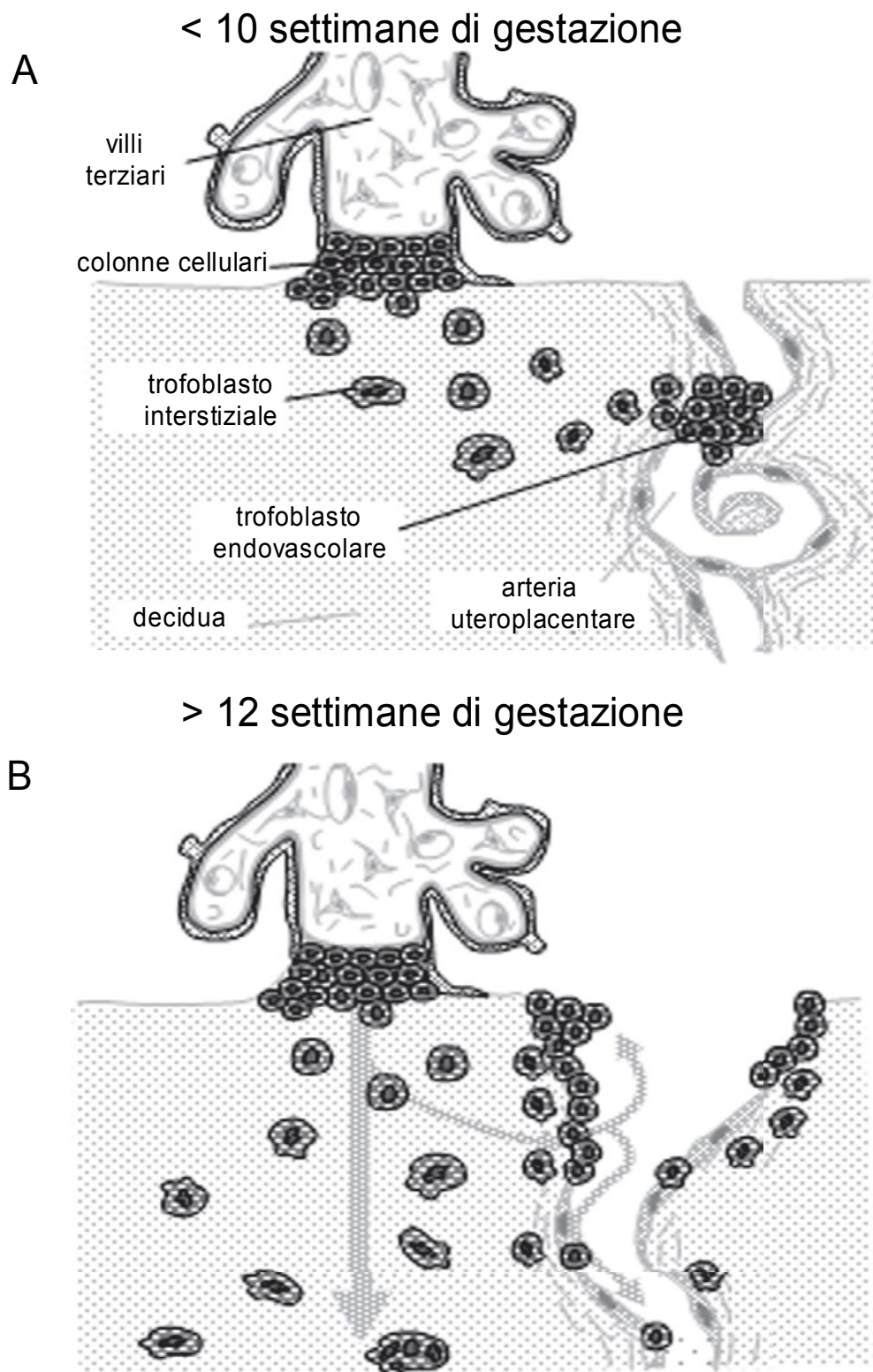


Figura 15. Eventi fondamentali nello sviluppo placentare II.

A. Durante le fasi iniziali del primo trimestre, il trofoblasto endovascolare occlude le arteriole spirali, inducendo ipossia intraplacentare per guidare l'angiogenesi villosa nella placenta definitiva o nel corium frondosum.

B. Alla fine del III trimestre, le occlusioni scompaiono, il sangue materno raggiunge i villi placentari e si ha ossigenazione di tutta la placenta.

Le frecce indicano la direzione dell'invasione del trofoblasto extravilloso.

- Sviluppo dei villi coriali

La transizione al secondo trimestre è caratterizzata dalla vascolarizzazione dei villi in via di sviluppo. Queste strutture comprendono villi terziari indifferenziati alla 12a settimana, ma si trasformano in un numero relativamente ridotto di assi villosi che portano il sangue fetale nell'elaborato albero villosa, in grado di scambiare nutrienti e gas [104]. Un semplice corollario è la produzione di rami, seguiti da boccioli e poi da foglie su di un albero, con i boccioli primaverili che rappresentano lo sviluppo placentare a 20 settimane di gestazione. Le generazioni di nuovi villi terziari si formano da villi intermedi immaturi (IIV) che rappresentano la zona di crescita dell'albero villosa. Gli IIV formano i germogli villosi mesenchimali da cui derivano a loro volta i rami dell'albero, come mostrato nella figura 15 [87, 105]. Gli IIV predominano durante questa fase precoce dello sviluppo placentare tra le 14 e le 20 settimane di gestazione quando la formazione dei villi staminali è più intensa. I macrofagi placentari ed il trofoblasto forniscono i fattori di crescita necessari per la crescita ed il rimodellamento dei vasi ematici stromali. I vasi centrali si espandono e sviluppano uno stroma circostante che contiene muscolatura liscia nelle branche prossimali per formare i villi staminali maturi [106]. Questi connettono gli alberi villosi con il piatto coriale. Circa 8-16 branche a suddivisione dicotomica irregolare dei villi staminali portano ai villi che scambiano gas. Gli IIV sono strutture scarsamente studiate nella patologia placentare, ma la loro posizione nello sviluppo li rende ottimi

candidati per il controllo delle dimensioni finali dell'albero villosa, che è rilevante per lo sviluppo dell'IUGR [107].

Quando il feto raggiunge la vitalità verso le 24 settimane, vi è un passaggio graduale dalla formazione di villi staminali di conduzione verso quella di villi terminali di scambio di gas e nutrienti. La fase fondamentale è la differenziazione degli IIV nelle loro controparti mature. Al contrario degli IIV, i villi intermedi maturi (MIV) non si autoreplicano; piuttosto si allungano e producono villi terminali per crescita longitudinale dei loro capillari. La crescita longitudinale dei capillari nei MIV è maggiore di quella dei villi [87]. Ne consegue che i villi sporgono lateralmente per formare diversi villi terminali, preposti allo scambio dei gas, che hanno un rivestimento sinciziotrofoblastico molto sottile (denominato "membrana vasculosinciziale"). Questa disposizione è ideale per il trasferimento di sostanze a diffusione limitata, quali l'anidride carbonica e l'ossigeno.

L'angiogenesi placentare è quindi fondamentale per un regolare sviluppo della placenta. D'altro canto, più che un singolo processo, si verifica un complesso passaggio dall'angiogenesi diramante e la maturazione di queste vasi in arteriole e vene muscolarizzate ad un'angiogenesi non diramante ed al prolasso dei capillari periferici attraverso la parete dei MIV per formare i villi terminali.

3.3 FATTORI DI CRESCITA NELL'ANGIOGENESI PLACENTARE

La regolazione dell'angiogenesi è complessa e prevede l'interazione di fattori inibitori e stimolanti [108]. Una delle famiglie di geni responsabili per la stimolazione dell'angiogenesi è quella del vascular endothelial growth factor (VEGF).

Il prototipo di questa famiglia è il VEGF-A, una glicoproteina eparinica, omodimerica di 30-46 kDa [109]. Questa proteina deriva da otto esoni e sono state identificate almeno cinque varianti di splicing. Sono stati identificati anche i VEGF-B, C, D ed E ed il placental growth factor (PGF) [110-114]. Il VEGF-A si lega a due recettori, il flt-1 ed il KDR (VEGFR-1 e VEGFR-2).

E' stata dimostrata l'espressione del VEGF-A nella placenta umana [115] con metodica RT-PCR, mentre tecniche di ibridazione in situ non hanno dimostrato l'espressione di VEGF-A nel citotrofoblasto o nel sinciziotrofoblasto [116]. Le cellule che maggiormente esprimono VEGF-A sono macrofagi endometriali localizzati nella zona necrotica tra la placenta e l'endometrio.

Per quanto riguarda i recettori, mentre l'ibridazione con VEGFR-2 si riscontra solo a livello delle cellule endometriali, sia nella decidua che nei villi, vi è intensa ibridazione per il recettore VEGF-1 nel citotrofoblasto e nel trofoblasto extravillioso durante tutta la gravidanza [117].

L'espressione di VEGF è regolata dall'ipossia, sia a livello trascrizionale, con un aumento dei livelli di mRNA in stati di bassa tensione di ossigeno, grazie al ruolo dell'hypoxia inducible factor (HIF-1) [118, 119], che a livello post-trascrizionale.

Le angiopoietine 1 e 2 sono coinvolte nella formazione della vascolarizzazione durante la vasculogenesi. Entrambi sono legandi per il recettore Tie2 (recettore tipo tirosin-kinasi, espresso dalle cellule endoteliali ed ematopoietiche). Le angiopoietine sono coinvolte principalmente nella stabilizzazione e nel rimodellamento dei plessi capillari primari e sono responsabili della sopravvivenza delle cellule endoteliali [120]. E' stato dimostrato che Ang-1 è espressa dal cito- e dal sinciziotrofoblasto, mentre Ang-2 e Tie2 sono prevalentemente espressi nel citotrofoblasto.

Il neuropeptide Y è composto da 36 aminoacidi ed è stato isolato per la prima volta a livello del sistema nervoso centrale e di quello periferico, nelle cellule cromaffini della midollare del surrene [121]. E' stata dimostrata la presenza di questo peptide a livello placentare nel citotrofoblasto e nel trofoblasto intermedio, mentre minore è il contenuto nella porzione periferica del villo [122]. L'evidenza che l'NPY incrementa il rilascio del corticotropin-releasing factor (CRF) da parte di cellule placentari in coltura [123, 124] ha fatto ipotizzare una possibile azione paracrina ed un sinergismo tra NPY e noradrenalina nella regolazione del CRF. Questa interazione indica che l'NPY potrebbe essere coinvolto nella regolazione del flusso ematico placentare,

poiché esso è espresso dai neuroni vasocostrittori sintetizzanti catecolamine [125].

E' stato dimostrato che il vasoactive intestinal peptide (VIP), un neurotrasmettitore e neuromodulatore con proprietà neurotrofiche, regola la crescita embrionaria nei roditori [126], promuove la crescita e la sopravvivenza neurale e modula la funzione immune [127]. E' stato riscontrato un gene per un recettore ad elevata affinità per il VIP nei tessuti placentari [127] e sono stati identificati siti di legame specifici per il VIP in cellule JEG-3 [128]. In queste cellule, il VIP attiva l'adenilciclastasi e modula l'espressione di hCG attraverso la via del cAMP [128]. La potenzialità del VIP di avere ruoli nella gravidanza è supportata dall'osservazione che la pecora gravida presenta livelli più elevati di VIP rispetto agli animali non gravidi [129]. Recentemente è stata dimostrata l'espressione di mRNA per il VIP da parte della placenta umana e la localizzazione della proteina nel cito- e nel sinciziotrofoblasto [130]. L'interesse per quanto riguarda il VIP nella regolazione del flusso ematico placentare deriva dalla sua presenza in neuroni vasodilatatori sintetizzanti acetilcolina [129].

3.4 INSUFFICIENZA PLACENTARE

L'insufficienza placentare e le sue manifestazioni patologiche, ovvero la pre-eclampsia ed il ritardo di crescita intrauterino, rappresentano un'ampia percentuale della patologia ostetrica ed hanno un profondo impatto sulla morbilità e sulla mortalità fetali.

- Pre-eclampsia

La pre-eclampsia è una patologia molto frequente indotta dalla gravidanza, caratterizzata da ipertensione, proteinuria ed ipoperfusione uteroplacentare, con conseguente ipossia placentare e si accompagna frequentemente a ritardo di crescita intrauterino [131, 132]. Sembra che questa patologia sia favorita da un'alterazione del processo di placentazione, con un rimodellamento deficitario delle arterie spirali, riduzione della differenziazione delle cellule trofoblastiche e danno ischemico del tessuto placentare [133, 134].

Queste alterazioni istologiche portano a modificazioni funzionali patologiche della circolazione utero-placentare (aumento delle resistenze nei vasi uteroplacentari e diminuzione del flusso ematico per il feto), impedendo quindi, l'instaurarsi della fisiologica circolazione a bassa resistenza. E' stato, infatti, dimostrato che un flusso delle arterie uterine durante il secondo trimestre, con un elevato indice di resistenza (IR) o persistenza di un notch

protodiastolico, è correlato con il rischio di sviluppare successivamente pre-eclampsia durante il corso della gravidanza [135-138].

L'ipoperfusione placentare induce la liberazione di sostanze tossiche per l'endotelio materno. Il danno endoteliale della parete vascolare caratterizza le alterazioni istopatologiche a livello renale ed epatico nonché delle arterie spirali ed ombelicali. Al danno endoteliale segue un'aumentata permeabilità, un'attivazione della coagulazione e una riduzione della refrattarietà vascolare agli stimoli pressori. Tali fenomeni portano ai segni clinici ed ai sintomi che si manifestano più tardivamente ed anche alle complicanze di questa patologia (Tabella 7).

Tabella 7. Complicanze della pre-eclampsia.

•	Distacco di placenta
•	CID
•	Accidenti cerebrovascolari o edema cerebrale materni
•	Insufficienza renale acuta
•	Edema polmonare acuto
•	Danno epatico
•	Sindrome HELLP
•	IUGR
•	Morte endouterina del feto

L'ipertensione gestazionale sembra inoltre essere dovuta ad un fenomeno di vasospasmo con aumentata reattività a fattori vasopressori come l'angiotensina II, le catecolamine e la vasopressina. Questa iperresponsività

vascolare è presente già dalle 18 settimane di gravidanza e precede l'insorgere dell'ipertensione vera e propria.

Inoltre, le cellule endoteliali delle pazienti gravide affette da pre-eclampsia potrebbero rilasciare numerosi fattori vasopressori come l'endotelina I (ET-I) che causa una vasocostrizione di lunga durata oltre che una stimolazione del rilascio di catecolamine. Infatti, i livelli di noradrenalina e di ET-I sono più elevati in pazienti con pre-eclampsia rispetto a donne con gravidanza normale o con ipertensione cronica.

- IUGR

Il ritardo di crescita intrauterina (IUGR – intrauterine growth restriction) implica che la crescita fetale è limitata da uno o più processi patologici. Al contrario, il termine “small for gestational age” (SGA) implica una crescita fetale appropriata, influenzata dalle dimensioni dei genitori e dalle caratteristiche del gruppo etnico di appartenenza, ed in genere questo quadro si associa ad una normale funzionalità placentare. La facilità con cui si può distinguere un IUGR da uno SGA è inversamente proporzionale all'epoca gestazionale e pone notevoli problemi nelle ultime fasi del terzo trimestre.

In base all'epoca di insorgenza si distinguono due forme di IUGR. Un IUGR ad insorgenza precoce, inteso come patologia che impone l'espletamento del parto prima delle 32 settimane di gestazione, può essere causato da infezioni congenite, aneuploidia, diverse patologie genetiche, e

dall'entità denominata “insufficienza vascolare uteroplacentare” caratterizzata da anomalie fluissimetriche delle arterie ombelicali ed uterine. L'IUGR ad insorgenza precoce è meno frequente delle forme ad insorgenza tardiva: in genere provoca la morte fetale o costringe a programmare un parto prima delle 32 settimane di gestazione, ed è caratterizzato da flusso telediastolico assente o addirittura invertito a livello dell'arteria ombelicale e da alterazioni dell'onda flussimetrica dell'arteria uterina. L'IUGR ad insorgenza tardiva, invece, si associa tipicamente ad asimmetria nella crescita fetale, flussimetrie ombelicale ed uterina normali, oligoidramnios e segni di maturità placentare all'esame ecografico.

Negli ultimi anni si sono effettuati numerosi progressi verso la piena comprensione di questa patologia. In primo luogo, si ha una maggiore conoscenza dei meccanismi di placentazione che ci consente di identificare l'alterato sviluppo placentare come causa primaria dell'insufficienza placentare. In secondo luogo, l'uso estensivo dell'ecografia consente agli operatori di identificare in modo accurato placente di feti con IUGR ad insorgenza precoce in modo da poter definire l'arrangiamento vascolare della placenta e di ottenere campioni patologici più significativi utilizzando la biopsia eco-guidata. Infine, considerare l'insufficienza placentare come un processo multifattoriale, consente di identificare i processi secondari che contribuiscono ad alterare lo sviluppo placentare e, in questo modo, arrivare ad

opportunità terapeutiche per cercare di preservare la funzione placentare anche se lo sviluppo alterato, ormai instaurato, non può più essere corretto.

Il concetto che un'alterata invasione EVT delle arterie spirali causi ischemia placentare, sviluppo di pre-eclampsia e/o IUGR ha portato a studiare l'espressione di VEGF da parte delle placente associate a queste patologie. *Kingdom e Kaufmann* [139] hanno suggerito che si possono avere tre tipi di ipossia nell'unità feto-placentare. Queste sono: 1) ipossia preplacentare, nella quale sia la madre che il feto si trovano in uno stato di ipossia, come si verifica per esempio, ad altitudini elevate; 2) ipossia utero-placentare, nella quale l'ossigenazione materna è normale, ma l'alterata circolazione utero-placentare causa ipossia placentare e fetale con flusso diastolico conservato a livello delle arterie ombelicali, come si verifica in caso di pre-eclampsia; 3) ipossia post-placentare, nella quale si ritiene che solo il feto sia in stato ipossico, con flusso diastolico ombelicale ridotto, assente o invertito. Un altro tipo di classificazione di questi stati patologici prevede la distinzione in IUGR ad insorgenza precoce e tardiva, come sopra riportato. In questa classificazione, l'IUGR ad insorgenza tardiva comprende i casi di ipossia utero-placentare e fetale.

E' emerso dallo studio di alcuni autori che nelle gravidanze pre-eclamptiche il VEGF è risultato ridotto [140, 141]. Questi risultati non coincidono con la teoria che vorrebbe che l'ipossia placentare stimoli l'espressione di questo fattore di crescita. La ragione per cui l'espressione di

VEGF è ridotta in queste gravidanze non è nota, ma suggerisce che la placenta potrebbe non essere sempre in grado di rispondere alla condizione di ipossia con la produzione di VEGF. In caso di ipossia post-placentare associata ad IUGR ad insorgenza precoce, si ritiene che i villi placentari siano esposti ad una maggiore tensione di ossigeno o “iperossia” placentare [139]. Questo concetto è sostenuto dall’osservazione che il contenuto di ossigeno del sangue venoso uterino è simile ai valori arteriosi nelle gravidanza complicate da IUGR grave [142] e che l’espressione di VEGF è ridotta [142, 143].

Per meglio comprendere la regolazione dei fattori di crescita endoteliale, si devono prendere in considerazione gli effetti a valle dell’interazione del VEGF con diversi recettori che possono influenzare la circolazione placentare. L’espressione di ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) e di angiopoietina 2 [144,145] è stimolata dal VEGF. Nelle ultime fasi delle gravidanze complicate da pre-eclampsia o IUGR, l’espressione di eNOS nel sinciziotrofoblasto è aumentata [146], così come la concentrazione di ossido nitrico a livello del sangue venoso ombelicale [141]. Questa potrebbe essere una risposta compensatoria per migliorare il flusso ematico nella placenta complicata da IUGR. Questi dati però non sono in accordo con quelli che mostrano una riduzione dell’espressione di VEGF nelle placente di gravidanze complicate da IUGR [141,143]. Questa apparente discrepanza può essere causata dal tipo di IUGR presente in questi studi. Altrimenti, potrebbero esistere diversi pathways per il VEGF e l’eNOS. Oltre all’eNOS, sia l’ipossia

che il VEGF stimolano l'espressione di angiopoietina 2 (Ang-2) [146] e l'Ang-2 stimola il rilascio di NO da parte di cellule trofoblastiche umane in vitro [147]. L'angiopoietina 1 (Ang-1) è stata localizzata nello strato citotrofoblastico della placenta umana del primo trimestre [147], mentre l'angiopoietina 2 è stata riscontrata nello strato citotrofoblastico [147] e nel sinciziotrofoblasto [148] ed il loro recettore, il Tie2, è stato rilevato nello strato citotrofoblastico [147] e nell'ETV [148]. Mentre l'Ang-1 agisce sinergisticamente con il VEGF [149] nello stimolare l'angiogenesi, l'Ang-2 è un antagonista dell'Ang-1 ed in assenza di VEGF si pensa destabilizzi o faccia regredire i vasi [150]. A termine, nelle placente con IUGR grave, le concentrazioni di mRNA per Ang-2 non sono risultate differenti dalle placente normali, ma la quantità di proteina Ang-2 era significativamente ridotta.

Resta da valutare quale sia l'impatto funzionale rivestito dalle alterazioni dell'espressione dei fattori di crescita vascolare e dei loro recettori sul rilascio di ossigeno e di nutrienti al feto durante le fasi tardive della gravidanza.

3.5 SCOPO DELLO STUDIO

b – Espressione dei fattori angiogenici e dei peptidi vasoattivi nelle placenti normali ed affette da preeclampsia

Come già precedentemente affermato, l'insufficienza placentare e le sue manifestazioni patologiche, ovvero la pre-eclampsia ed il ritardo di crescita intrauterino, rappresentano un'ampia percentuale della patologia ostetrica ed hanno un profondo impatto sulla morbilità e sulla mortalità fetali.

Ad oggi non esistono terapie efficaci nè strategie di prevenzione che possano ridurre l'incidenza di queste alterazioni. Notevoli sviluppi sono stati effettuati nel campo dell'ecografia e della flussimetria per poter in qualche modo prevedere l'insorgenza delle patologie, ma i risultati da un punto di vista terapeutico sono stati deludenti.

Appare necessario, quindi, approfondire le conoscenze fisiopatologiche della formazione placentare e della sua vascolarizzazione, nonché del controllo molecolare degli stati ipossici, in modo da poter approntare o opportunità terapeutiche efficaci o strategie preventive per favorire una placentazione efficace.

A questo scopo, il nostro interesse si è rivolto verso i fattori angiogenetici notoriamente coinvolti in questo processo, ovvero il VEGF, l'angiopoietina 1 e l'angiopoietina 2, cercando di valutare sia l'espressione sia la localizzazione delle proteine a livello del trofoblasto di gravidanze e

fisiologiche e patologiche, e nel caso delle gravidanze patologiche, selezionare accuratamente i casi in modo da renderli quanto più omogenei possibile. Inoltre, abbiamo voluto investigare anche il comportamento di tre neuropeptidi, l'NPY, l'SP ed il VIP, coinvolti nella regolazione dei vasi, rispettivamente vasocostringente il primo e vasodilatanti gli altri.

Queste molecole regolerebbero l'angiogenesi nelle prime fasi di placentazione, quando verosimilmente si verifica la noxa patogena (del resto ancora non nota), che porterebbe ad una riduzione della vascolarizzazione placentare, causa a monte dell'insufficienza placentare, e successivamente potrebbero regolare il flusso ematico in condizioni di ipossia. La conoscenza di questi meccanismi potrebbe in qualche modo portare all'identificazione di sostanze adiuvanti la vascolarizzazione in una prima fase e, successivamente, favorire i meccanismi vasodilatanti rispetto a quelli vasocostrittivi, con conseguente miglioramento del flusso ematico utero-placentare.

3.6 MATERIALI E METODI

Abbiamo reclutato consecutivamente venti donne con gravidanza fisiologica singola e dieci donne la cui gravidanza era complicata da ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Le donne sono state reclutate presso l'ambulatorio di ostetricia del nostro Dipartimento. La diagnosi di IUGR è stata posta utilizzando il 10° percentile dei valori di riferimento per feto di epoca gestazionale simile in Italia [151]. La diagnosi di IUGR è stata confermata alla nascita in base al fatto che il peso del neonato era inferiore al 10° percentile degli standard italiani di peso alla nascita ed epoca gestazionale [152]. Tutte le pazienti hanno fornito il loro consenso informato a partecipare allo studio. Tutte le ecografie sono state effettuate dallo stesso operatore utilizzando un apparecchio Toshiba Powervision 6000 con una sonda trans-addominale convex di 5 MHz (Toshiba Medical Systems, Roma, Italia). Tra l'ultima ecografia e la nascita non sono mai trascorsi più di sette giorni. Al momento del parto è stato prelevato un cotiledone placentare che veniva diviso in due parti, di cui una immediatamente fissata in formalina per l'esecuzione degli studi di immunoistochimica e l'altra congelata e conservata a -80°C per l'analisi con RT-PCR.

IMMUNOISTOCHIMICA

- Anticorpi

Su tutti i campioni è stata effettuata la valutazione dell'espressione tramite metodica PCR e quantificazione delle proteine con immunoistochimica secondo queste metodiche: sono stati utilizzati anticorpi monoclonali e policlonali come antisieri primari per tutti i peptidi valutati; un complesso (avidina-biotina-perossidasi) (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA) è stato utilizzato per rilevare i complessi antigene-anticorpo.

- Metodo immunoenzimatico

Dopo la sparaffinatura, le sezioni ottenute sono state fissate con acetone (4°C) per 10 minuti. La perossidasi endogena è stata inibita da perossido di idrogeno allo 0,3% in soluzione salina phosphate-buffered (PBS) per 30 minuti. Sezioni di tessuto mammario e di tessuto cerebrale sono stati processati alla stessa maniera ed utilizzati quali controlli positivi. Le sezioni sono state quindi sciacquate 3 volte in PBS al pH di 7.3 per 5 minuti ed incubate per 10 minuti con NGS (normal goat serum) alla diluizione di 1:20 e poi tutta la notte a temperatura ambiente con gli antisieri primari. Sezioni di controlli negativi sono state incubate con NRS (normal rabbit serum), mentre antisieri non correlati, quali anticorpi monoclonali di topo anti-insulina 1:1.500 ed anticorpi policlonali di coniglio anti-glucagone 1:3.000 sono stati utilizzati per colorare tessuto pancreatico come controlli positivi della reazione immunoenzimatica.

Per rilevare enzimaticamente gli antigeni è stato utilizzato un enhancement di Nickel solfato con cromogeno di-amino-benzidina (DAB) in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) allo 0,03 %. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina.

ANALISI COMPUTERIZZATA DI IMMAGINE

Un software avanzato per analisi di immagini è stato utilizzato per quantificare l'immunopositività delle sezioni. Le immagini sono state acquisite direttamente mediante un microscopio ottico Leitz Axiophot con un ingrandimento a 20X utilizzando una video-camera specializzata. Le aree istologiche esaminate di ogni sezione sono state acquisite e successivamente processate. La qualità ottica di tali aree è stata ottimizzata modificando la luminosità ed il contrasto. Le aree immunoreattive sono state evidenziate e quindi quantificate dal programma sulla base dei loro livelli di grigio. La superficie occupata dagli antigeni è stata espressa come percentuale di aree positive per la specifica reazione immunoistochimica rispetto all'area totale esaminata (pixels positivi/pixels totali). Questa misurazione è stata realizzata su 5 sezioni per ciascuna biopsia e sono stati analizzati 6 campi per sezione. È stato calcolato il valore medio della concentrazione degli antigeni derivato dall'analisi di tutte le aree nelle 5 sezioni. Le sezioni sono state esaminate ed acquisite da 3 osservatori indipendenti, all'oscuro del gruppo di appartenenza delle pazienti.

SEMIQUANTITATIVA

Abbiamo utilizzato la RT-PCR per analizzare l'espressione del gene target. L'RNA totale è stato isolato lisando i campioni congelati (150-300mg) in soluzione di Trizol in accordo con il protocollo della casa produttrice. L'RNA è stato precipitato e quantificato mediante spettroscopia. Una quantità pari a 2 mg per ogni campione è stato retrotrascritto utilizzando il First-Strand cDNA Synthesis Kit in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Il cDNA ottenuto da ciascun campione è stato utilizzato per la successiva amplificazione attraverso PCR con i sets di primers preparati per il gene target ed i geni housekeeping gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) e beta-actina (β -actin). L'amplificazione del gene GAPDH è stata utilizzata come doppio controllo interno. È stato calcolato il rapporto tra i campioni ed il gene housekeeping per normalizzare le variazioni iniziali delle concentrazioni del campione e come controllo dell'efficienza della reazione. Allo scopo di prevenire inaccurately quantitative derivanti da effetti competitivi e da differenze di efficienza e di ranges di amplificazione dei cDNAs, i geni target ed i cDNAs GAPDH generati dalla stessa reazione di retrotrascrizione sono stati amplificati in provette separate contenenti volumi crescenti della reazione di retrotrascrizione (1, 2, 4 e 8 μ l), per documentare l'amplificazione in una regione lineare per ciascun cDNA. Le sequenze dei primers sono state disegnate utilizzando il software Primer 3 disponibile on-line su

<http://www-genome.wi.mit.edu>. La PCR semiquantitativa (PCR) è stata effettuata in un volume totale di 50 μ l. È stato importante selezionare un appropriato numero di cicli di amplificazione in modo tale che il prodotto fosse chiaramente visibile su gel di agarosio e potesse essere quantificato, ma anche affinché l'amplificazione avvenisse in un range esponenziale e non raggiungesse un plateau di saturazione. Il numero ottimale di cicli è rientrato nello stesso range per lo specifico RNA di interesse. Quando la temperatura di appaiamento dei due sets di primers è risultata differente, modificando le stesse temperature di appaiamento è stata testata ed ottenuta la temperatura ottimale per ogni set di primer. La miscela di reazione conteneva 3 μ l of cDNA, 10-20 pmol di ogni primer, 200 mM per ogni dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$ e 1 unità di Taq polimerasi con la soluzione provvista dal kit. L'amplificazione è stata effettuata in un Techgene Thermal Cycler alle seguenti condizioni: 95°, 5 minuti di iniziale fase di denaturazione; 95° C, 1 minuto; 55° C, 1 minuto; 72° C, 1 minuto per 18-24 cicli; 72° C, 10 minuti, estensione finale. In ciascun esperimento, la possibile contaminazione del DNA è stata determinata da una reazione di controllo, in cui il cDNA è stato omesso dalla miscela di reazione e sostituito da acqua priva di contaminazione da parte di acidi nucleici (DNA ed RNA). I prodotti amplificati (12 μ l di ogni campione) sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro, fotografato poi sotto illuminazione con luce ultravioletta. I livelli di RNA trascritto sono stati stimati mediante un metodo densitometrico e normalizzati con i controlli.

Le analisi densitometriche dei prodotti PCR sono state effettuate utilizzando il software di immagini ImageJ v1.29 disponibile on-line su <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. I valori densitometrici dei prodotti PCR generati da volumi crescenti di reazione di retrotrascrizione sono stati rapportati al prodotto dei segnali del gene target e dei geni GAPDH e β -actine per ciascun campione (unità densitometriche/ μ l di reazione di retrotrascrizione). I dati sono stati espressi con la media \pm SD. Tutti i prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il kit di purificazione QIAquick PCR e sono stati controllati mediante un sequenziamento automatico di DNA su entrambi i filamenti utilizzando una reazione chimica di analisi di sequenza con il sequenziatore Applied biosystem Model 373 $^{\circ}$ DNA.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Statistical Package for Social Science (SPSS, versione 10.0). Per stimare la distribuzione dei dati è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilks e tutte le variabili hanno mostrato una distribuzione normale. Per valutare le differenze nei livelli (con immunoistochimica) e nell'espressione (con RT-PCR) di VEGF, Ang-1, Ang-2, VIP e NPY nei 2 gruppi di studio è stato utilizzato il test t di Student per dati non appaiati.

3.7 RISULTATI

Non abbiamo riscontrato differenze per quanto riguarda l'età delle pazienti dei due gruppi, mentre l'epoca gestazionale, il peso fetale alla nascita ed il peso della placenta sono risultati significativamente inferiori nelle pazienti con IUGR (Tabella 8).

Tabella 8. Caratteristiche delle pazienti.

Variabili	Normali (<i>n</i> = 20)	IUGR (<i>n</i> = 10)
Età (anni)	31.2±6.0	28.9±9.1
BMI (kg/m ²)	25.1±1.0	25.0±1.3
Peso alla nascita (g)	2928.7±386.4*	1543.3±181.7
Peso placentare (g)	552±21*	391±15
Maschi/femmine	9/11	4/6
Fumatrici (%)	60%	60%

* = $p < 0.05$ vs. IUGR

Tutti i peptidi studiati hanno mostrato un contenuto significativamente inferiore nelle placente da gravidanze complicate da IUGR in confronto con le placente normali da gravidanze fisiologiche (Tabella 9, Figure 16-20), ad eccezione dell'NPY, il cui contenuto era significativamente maggiore nelle placente patologiche (Tabella 9, Figure 16, 17, 18, 21).

Lo stesso tipo di risultato è stato riscontrato per quanto riguarda l'espressione. Infatti, i fattori angiogenetici ed il VIP presentavano un'espressione significativamente inferiore nelle gravidanze patologiche rispetto a quelle fisiologiche (Tabella 10, Figure 18-20) ad eccezione

dell'NPY, anche in questo caso espresso in quantità significativamente maggiori (Tabella 10, Figure 18-21).

Tabella 9. Immunolocalizzazione dei peptidi valutati in placente normali e in placente da gravidanze complicate da IUGR e pre-eclampsia.

	Gravidanze fisiologiche	Gravidanze patologiche	Significatività (p)
VEGF	1.81±0.22	1.36±0.23	< 0.01
Ang-1	1.64±0.19	1.37±0.16	< 0.01
Ang-2	1.56±0.16	1.27±0.15	< 0.01
VIP	1.61±0.13	1.32±0.16	< 0.01
SP	1.61±0.12	1.32±0.11	< 0.01
NPY	0.87±0.29	1.53±0.10	< 0.01

Tabella 10. Espressione dei peptidi valutati in placente normali e in placente da gravidanze complicate da IUGR e pre-eclampsia.

	Gravidanze fisiologiche	Gravidanze patologiche	Significatività (p)
VEGF	1.31±0.25	1.02±0.13	< 0.01
Ang-1	1.35±0.21	1.06±0.11	< 0.01
Ang-2	1.32±0.12	0.98±0.05	< 0.01
VIP	1.41±0.13	1.12±0.17	< 0.01
SP	1.431±0.16	1.04±0.12	< 0.01
NPY	0.77±0.19	1.34±0.14	< 0.01

Figura 16. Immunolocalizzazione dei fattori studiati. $P < 0.01$ per tutti i valori ad eccezione di SP 100.

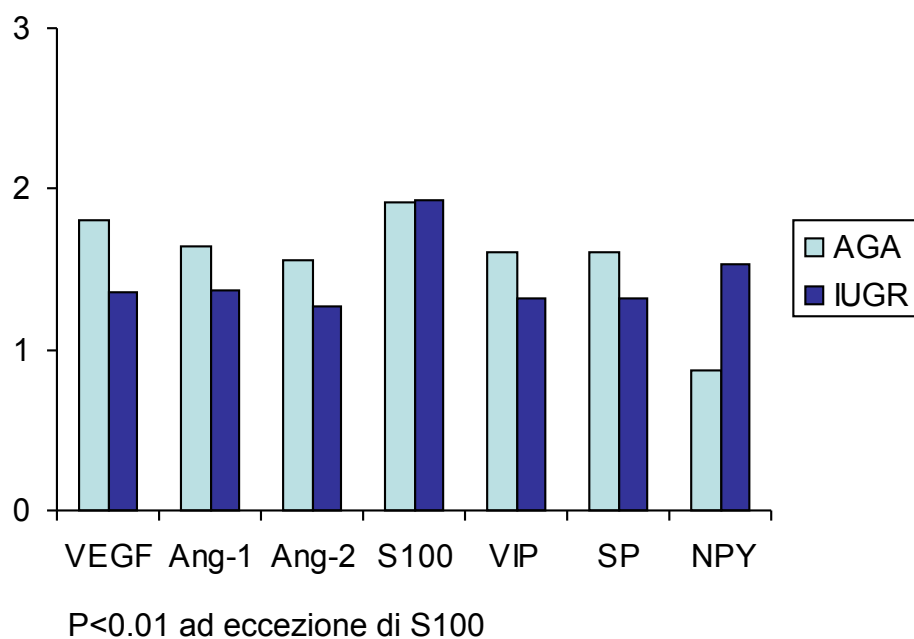


Figura 17. Espressione dei fattori studiati. $P < 0.01$ per tutti i valori ad eccezione di SP 100.

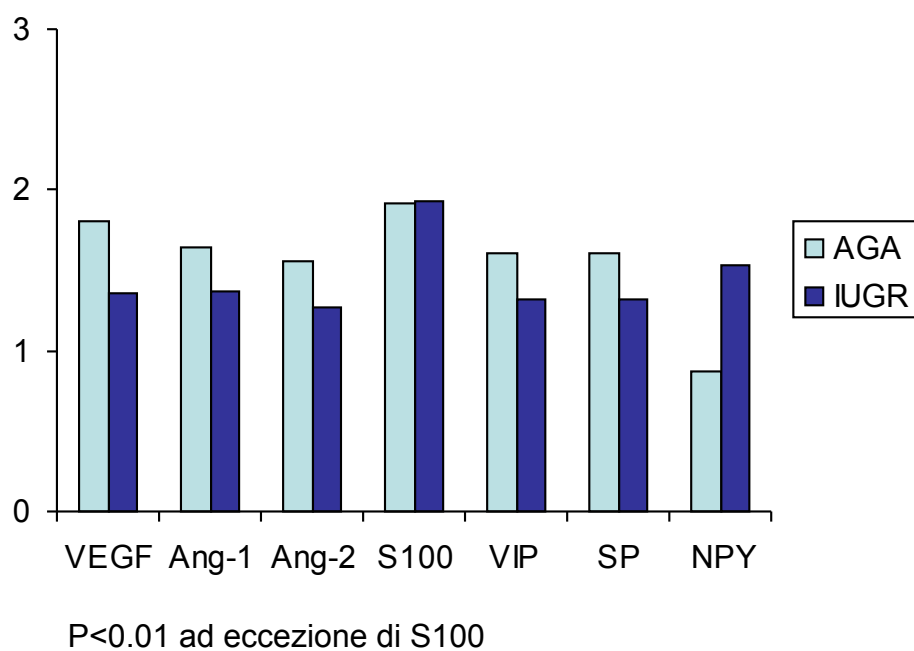


Figura 18. A. Immunolocalizzazione di VEGF nelle placente con IUGR. B. Immunolocalizzazione di VEGF nelle placente fisiologiche. C. RT-PCR mRNA VEGF.

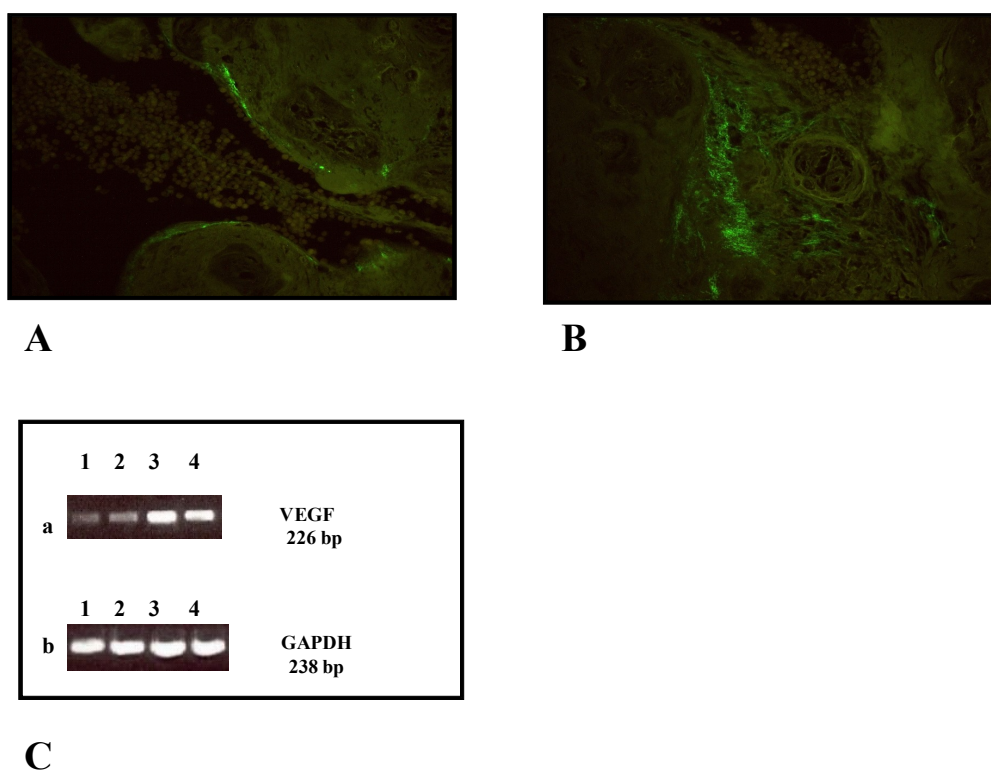
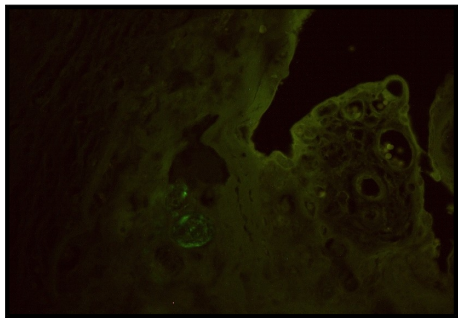
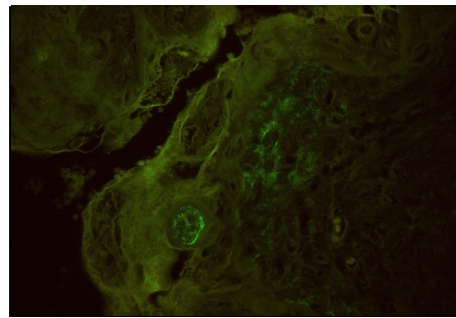


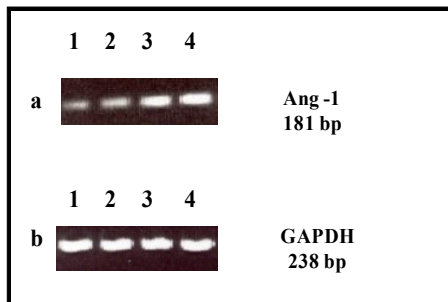
Figura 19. A. Immunolocalizzazione di Ang-1 nelle placente con IUGR. B. Immunolocalizzazione di Ang-1 nelle placente fisiologiche. C. RT-PCR mRNA Ang-1.



A

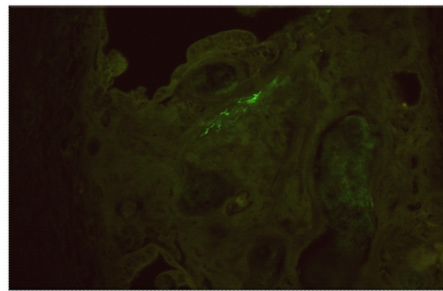


B

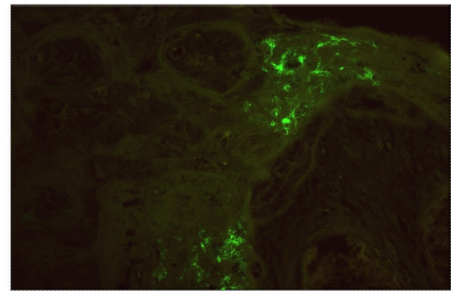


C

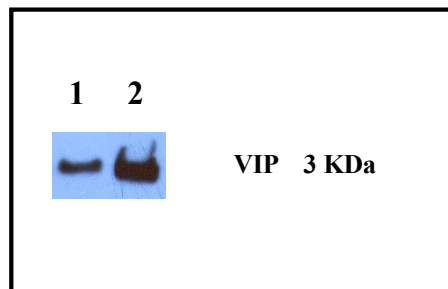
Figura 20. A. Immunolocalizzazione di VIP nelle placente con IUGR. B. Immunolocalizzazione di VIP nelle placente fisiologiche. C. RT-PCR mRNA VIP.



A

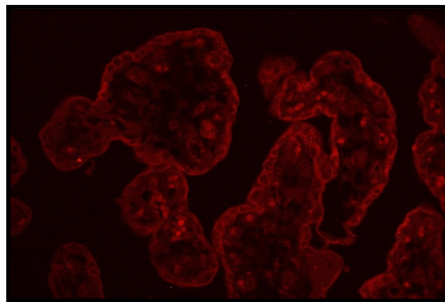


B

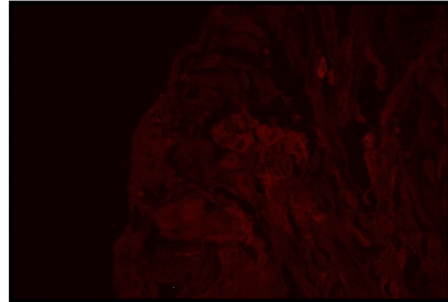


C

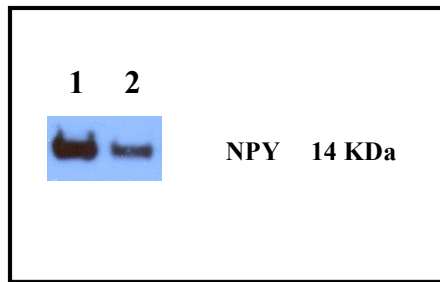
Figura 21. A. Immunolocalizzazione di NPY nelle placente con IUGR. B. Immunolocalizzazione di NPY nelle placente fisiologiche. RT-PCR mRNA NPY.



A



B



C

3.8 DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato che nelle placenti umane da gravidanze complicate da IUGR, l'espressione di fattori angiogenetici e di peptidi vasoattivi con azione vasodilatante è ridotta rispetto alle placenti normali da gravidanze fisiologiche. Questo potrebbe indicare che in caso di IUGR, causato verosimilmente da difetto di placentazione e conseguente ipossia, i fattori angiogenetici risultano essere significativamente sottoespressi ed il loro contenuto inferiore rispetto alle placenti da gravidanze fisiologiche.

In uno studio di *Wathén et al.* [153], è stato dimostrato che i livelli circolanti materni di VEGFR1 risultano elevati nelle pazienti che sviluppano pre-eclampsia grave ed IUGR già a 16-20 settimane di gestazione, prima di sviluppare clinicamente la malattia. Questo aumento del recettore solubile del VEGF potrebbe neutralizzare il VEGF e contribuire ad una vascolarizzazione placentare inadeguata.

Il nostro studio è in accordo con i dati di *Cooper et al.* [140], i quali hanno dimostrato una riduzione dell'espressione di mRNA per il VEGF da parte di placenti provenienti da gravidanze con pre-eclampsia. E' interessante il dato che lo stesso gruppo [154] ha anche dimostrato un aumento dei livelli sierici materni di questo fattore angiogenetico.

Similmente, anche *Lyall et al.* [141] hanno riscontrato un'intensità dell'immunostaining per il VEGF significativamente ridotto in gravidanze con

pre-eclampsia e IUGR rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che questa riduzione del VEGF possa essere almeno in parte responsabile dell'alterazione del processo di vascolarizzazione caratteristico di queste condizioni.

A nostra conoscenza, questo è il primo studio che ha valutato l'espressione dell'angiopoietina 1 e 2 da parte di placenta umana da gravidanze complicate da pre-eclampsia e IUGR. Nel nostro studio, questi fattori angiogenetici mostrano un comportamento simile, con livelli ridotti nelle gravidanze patologiche.

Malamitsi-Puchner et al. [155] hanno valutato le concentrazioni di angiopoietina 2 su sangue di cordone e di neonati con IUGR e non hanno riscontrato differenze rispetto ai neonati AGA (appropriate for gestational age), ipotizzando che l'ipossia presente in questi casi non abbia portato ad un aumento dell'angiopoietina 2.

Al contrario, *Hagen et al.* [156], studiando l'espressione di Ang-1 e Ang-2 in un modello ovino di IUGR, hanno riscontrato una maggiore espressione di Ang-1 e Ang-2 nei cotiledoni placentari a 55 giorni di gestazione, con una riduzione di questi livelli a 135 giorni.

Anche i dati riguardo l'espressione dei peptidi vasoattivi da parte di placente umane da gravidanze con pre-eclampsia e IUGR sono scarsi.

Dötsch et al. [157] hanno riscontrato livelli significativamente inferiori di NPY nelle placente umane da gravidanze con pre-eclampsia e IUGR rispetto alle gravidanze fisiologiche, mentre *Kokot et al.* [158] hanno dosato i livelli di

NPY nel cordone di donne con pre-eclampsia e donne con gravidanza fisiologica. Questi autori hanno riscontrato livelli più elevati nelle gravidanze fisiologiche. Al contrario, *Rajakumaar et al.* [159], valutando l'espressione di NPY nel cervello di animali da laboratorio, le cui madri erano state sottoposte a legatura delle arterie uterine con conseguente insufficienza utero-placentare e IUGR, hanno riscontrato uno sbilancio pretrascrizionale delle concentrazioni cerebrali di mRNA per l'NPY e livelli invariati del peptide.

In un precedente studio [160], sono stati riscontrati livelli significativamente più elevati di VIP nelle gravidanze con pre-eclampsia rispetto a quelle fisiologiche, suggerendo che questo potesse essere un potente meccanismo di compenso di perfusione vascolare utero-placentare.

In questo studio effettuato su pazienti affette da IUGR, causato da insufficienza placentare, appare uno scenario caratterizzato da una riduzione generalizzata di fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi dilatanti ed un aumento di molecole vasocostrittrici, indicando la presenza di un ridotto sviluppo della neoangiogenesi placentare ed una risposta tendenzialmente vasocostrittrice a livello dell'interfaccia materno-fetale.

Il VEGF è un importante fattore di crescita vasoattivo che aumenta la permeabilità vascolare ed induce un'attivazione delle cellule endoteliali. Legandosi al suo recettore R2 promuove la differenziazione delle cellule mesodermiche in cellule endoteliali e regola lo sviluppo dei capillari tubulari [161].

L'Ang-1 è una citochina che amplificherebbe gli effetti del VEGF, non potendo però attivare indipendentemente l'angiogenesi [162], mentre l'Ang-2 è l'antagonista endogeno dell'Ang-1 per lo stesso recettore [150].

Inoltre, come precentemente detto, il VEGF stimolerebbe la secrezione di Ang-2 da parte della placenta e l'Ang-1 coadiuverebbe il VEGF nella neoangiogenesi placentare. La generalizzata riduzione dei fattori angiogenetici osservata nelle pazienti con gravidanza complicata da IUGR indurrebbe ad ipotizzare un quadro con un primitivo deficit di VEGF e conseguente riduzione degli altri fattori angiogenetici valutati. Considerando che è stato dimostrato che l'ipossia stimola la secrezione di Ang-2, come precedentemente riportato, si può ipotizzare che in queste pazienti, questo meccanismo di compenso possa essere assente o essersi esaurito.

I neuropeptidi vasoattivi sono espressi, oltre che dalle terminazioni nervose, anche da parte della placenta [130, 157]. Questo potrebbe far ipotizzare un loro effetto diretto sui vasi placentari e la loro azione potrebbe rappresentare un meccanismo di compenso in caso di ipossia placentare.

In questa serie di pazienti, anche i neuropeptidi vasoattivi sembrano indicare un generalizzato stato di ipossia con assenza od esaurimento dei meccanismi compensativi. Infatti, l'NPY, che possiede un'azione vasocostrittiva risulta significativamente sovraespresso nelle pazienti con IUGR.

Questi risultati sono in parte in contrasto con i dati presenti in letteratura. Bisogna considerare che l'insufficienza placentare, alterazione la cui patogenesi si cerca di comprendere per poterla prevedere, ha espressioni cliniche profondamente diverse con gravità differenti.

Può essere infatti: a) clinicamente irrilevante, con esito completamente fisiologico della gravidanza e rilevabile esclusivamente con metodiche strumentali (flussimetria delle arterie uterine); b) manifestarsi come pre-eclampsia; c) indurre un rallentamento o un arresto della crescita fetale; d) presentarsi come associazione di queste due manifestazioni cliniche. E' facile attendersi dati differenti nell'espressione dei fattori angiongenetici e dei peptidi vasoattivi a seconda delle diverse manifestazioni cliniche e dei diversi gradi di gravità della patologia. Le discrepanze sarebbero facilmente spiegabili con le diverse popolazioni osservate.

Altra ipotesi potrebbe essere che si osservi lo stesso fenomeno in diverse fasi dell'insufficienza placentare, a seconda che i meccanismi di compenso siano attivi o si siano esauriti.

Non è infine da escludere che queste discrepanze siano dovute a differenze nell'epoca gestazionale alla nascita (le pazienti con gravidanze complicate da IUGR e pre-eclampsia tendono a partorire prima), nel peso alla nascita e/o nel peso placentare.

3.9 CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo valutato l'espressione di fattori angiogenetici e di fattori vasoattivi in pazienti con gravidanza complicata da pre-eclampsia e IUGR, ipotizzando che queste molecole potessero avere un ruolo nello sviluppo della malattia. Abbiamo rilevato una riduzione significativa dei fattori angiogenetici e dei peptidi vasodilatanti, associata ad un aumento dell'NPY (peptide vasocostrittore) nelle gravidanze patologiche.

Questi dati portano ad ipotizzare come meccanismo patogenetico un deficit della formazione di neovasi a livello di queste placenti, causato dalla riduzione di VEGF e conseguentemente di Ang-1 e Ang-2, con conseguente ipossia dovuta ad un ipoafflusso di sangue. A questa ipossia potrebbero partecipare i peptidi vasoattivi. Questo quadro potrebbe esprimere una situazione "terminale", nella quale i meccanismi di compenso (aumento della vasodilatazione) potrebbero essere stati esauriti.

Ulteriori studi che mettano in relazione i movimenti dei peptidi vasoattivi con la valutazione del flusso ematico mediante flussimetria, potrebbero fornire ulteriori informazioni sulla fisiopatologia di questa manifestazione clinica.

CAPITOLO 4 - BIBLIOGRAFIA

1. Spuijbroek MD, Dunselman GA, Menheere PP, Evers JL. *Early endometriosis invades the extracellular matrix*. Fertil Steril 1992; 58 (5):929-33.
2. Mulayim N, Savlu A, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Arici A. *Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8*. Fertil Steril 2004; 81 (Suppl 1):904-11.
3. Gilabert- Estellés J, Ramon LA, Espana F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, Castellò R, Chirivella M, Estellés A. *Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase system*. Human Reprod 2007; 22 (8):2120-27.
4. Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ. *2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 {alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis*. Am J Pathol 2008; 72 (2):534-44.
5. Sokolov DI, Solodovnikova NG, Pavlov OV, Niauri DA, Volkov NN, Sel'kov SA. *Study of cytokine profile and angiogenic potential of peritoneal fluid in patients with external genital endometriosis*. Bull Exp Biol Med 2005; 140 (5):541-4.
6. Champion KJ, Guinea M, Dammai V, Hsu T. *Endothelial function of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: control of fibroblast growth factor receptor signalling*. Cancer Res 2008; 68 (12):4649-57.
7. Krikun G, Schatz F, Lockwood CJ. *Endometrial angiogenesis: from physiology to pathology*. Ann N Y Acad Sci 2004; 1034:27-35.
8. Drenkhahn M, Gesher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik E. *Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane*. Fertil Steril 2004; 81 (Suppl 1):869-75.
9. Shaw RW. *Endometriosis. Current understanding and Management*. Blackwell, Oxford, 1995.
10. Candiani GB, Candiani M. *Chirurgia ginecologica conservativa. Tecniche tradizionali ed endoscopiche a confronto*. Masson, Milano, 1999.

11. Venturini P, Evers JLH. *Endometriosis: Basic Research and Clinical Practice*. The Parthenon Publ Group, London, 1999.
12. Danesino V, Bolis PF. *Endometriosi*. In: *Ginecologia e Ostetricia*. Monduzzi Ed., Bologna, 1987.
13. Gruppo Italiano per lo Studio dell' endometriosi. *Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study*. Gruppo italiano per lo studio del' endometriosi. Hum Reprod 1994; 9 (6): 1158-62.
14. Eskenazi B, Warner ML. *Epidemiology of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24 (2):235-58.
15. Sanfilippo JS. (1994). *Chronic pelvic pain: medical and surgical approach*. In Sanfilippo JS, Muram D, Lee P, Dewhurst J. (eds.) *Pediatric and Adolescent Gynecology* (Philadelphia: W.B. Saunders).
16. Chatman DL. *Endometriosis in the black woman*. Am J Obstet Gynecol 1976; 125 (7):987-9.
17. Houston DE. *Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race and socioeconomic status*. Epidemiol Rev 1984; 6:167-91.
18. Cramer DW, Missmer SA. *The epidemiology of endometriosis*. Ann N Y Acad Sci 2002; 955:11-22.
19. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. *The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise*. JAMA 1986; 255 (14):1904-8.
20. Pauwels A, Schepens PJ, D'Hooghe T, Delbeke L, Dhont M, Brouwer A, Weyler J. *The risk of endometriosis and exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls: a case-control study of infertile women*. Hum Reprod 2001; 16 (10):2050-5.
21. Birnbaum LS, Cummings AM. *Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis*. Environ Health Perspect 2002; 110 (1):15-21.
22. Mayani A, Barel S, Soback S, Almarog M. *Dioxin concentrations in women with endometriosis*. Hum Reprod 1997; 12 (2):373-5.

23. Pan LY. *Menstrual status as risk factors of endometriosis: a case-control study*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 1993; 28 (3):147-9.
24. Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalek AM, Selman S. *Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis*. Epidemiology 1993; 4 (2):135-42.
25. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. *Endometriosis: epidemiology and aetiological factors*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18 (2):177-200.
26. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Malspeis S, Willett WC, Hunter DJ. *Reproductive history and endometriosis among premenopausal women*. Obstet Gynecol 2004; 104 (5 Pt 1):965-74.
27. Vercellini P, Ragni G, Trespidi L, Oldani S, Crosignani PG. *Does contraception modify the risk of endometriosis?* Hum Reprod 1993; 8 (4):547-51.
28. Parazzini F, Di Cintio E, Chatenoud L, Moroni S, Mezzanotte C, Crosignani PG. *Oral contraceptive use and risk of endometriosis. Italian Endometriosis Study Group*. Br J Obstet Gynaecol 1999; 106 (7):695-9.
29. Vercellini P, Frontini G, De Giorgi O, Pietropaolo G, Pasin R, Crosignani PG. *Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen*. Fertil Steril 2003; 80 (3):560-3.
30. Maia H Jr, Casoy J, Correia T, Freitas LA, Pimentel K, Athayde C. *The effect of oral contraceptives on aromatase expression in the eutopic endometrium of patients with endometriosis*. Gynecol Endocrinol 2008; 24 (3):123-8.
31. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. *Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies*. Am J Obstet Gynecol 1980; 137 (3):327-31.
32. Moen MH, Magnus P. *The familial risk of endometriosis*. Acta Obstet Gynecol Scand 1993; 72 (7):560-4.
33. Moen MH. *Endometriosis in monozygotic twins*. Acta Obstet Gynecol Scand 1994; 73 (1):59-62.

34. Kennedy S. *The genetics of endometriosis*. J Reprod Med 1998; 43 (3 Suppl):263-8.
35. Kennedy S. *The genetics of endometriosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1999; 82 (2):129-33.
36. Dmowski WP. *Immunologic aspects of endometriosis*. 1st Congress Int Soc Gynecological Endocrinology, Parthenon, Carnforth, 1988.
37. Montemagno U, De Placido G et al. *Aspetti immunologici nell'endometriosi*. Atti SIGO, 65, Taormina, 1988.
38. Venturini PL, Semino A, Semino C, Melioli G, Ragni N. *Prospettive di immunoterapia dell' endometriosi*. Atti SIGO, 71, Palermo, 1995.
39. Massobrio M, Ardizzoja M, Carmuzzi CM, Comoglio F, Olivieri MG. *Aspetti immunologici dell' endometriosi: la risposta dell' ospite*. In Venturini, Prefumo, Evers (Eds): *Endometriosi: dalla Ricerca di Base alla Clinica*. Parthenon, London, 1998.
40. Evers JLH. *Patogenesi: perché le donne sviluppano l' endometriosi?* In Venturini, Prefumo, Evers (Eds): *Endometriosi: dalla Ricerca di Base alla Clinica*. Parthenon, London, 1998.
41. Startseva NV. *Clinical immunological aspects of genital endometriosis*. Akush Ginekol (Mosk) 1980; (3):23-6.
42. Weed JC, Arquembourg PC. *Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility?* Clin Obstet Gynecol 1980; 23 (3):885-93.
43. Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. *Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis*. Am J Obstet Gynecol 1992; 167:265-70.
44. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. *Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis*. Fertil Steril 1997; 67:1059-64.
45. Koyama N, Matsuura K, Okamura H. *Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Int J Gynecol Obstet 1993; 43:45-50.
46. Buyalos RP, Funari VA, Azziz R, Watson JM, Martinez-Maza O. *Elevated interleukin-6 levels in peritoneal fluid of patients with pelvic pathology*. Fertil Steril 1992; 58:302-6.

47. Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV, Taylor RN. *Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis*. Fertil Steril 1995; 63:929-32.
48. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. *Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Am J Obstet Gynecol 1996; 174:1522-6.
49. Zeyneloglu HB, Senturk LM, Seli E, Bahtiyar OM, Olive DL, Arici A. *The peritoneal fluid levels of interleukin-12 in women with endometriosis*. Am J Reprod Immunol 1998; 39:152-6.
50. Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR. *Interferon-gamma and interleukin-6 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis*. Am J Reprod Immunol 1994; 32:180-3.
51. Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. *Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis*. Am J Obstet Gynecol 1993; 169:1545-9.
52. Akoum A, Lemay A, Brunet C, Hebert J. *Cytokine-induced secretion of monocyte chemotactic protein-1 by human endometriotic cells in culture. The Groupe d' Investigation en Gynecologie*. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:594-600.
53. FuKaya T, Sugawara J, Yoshida H, Yajima A. *The role of macrophage colony stimulating factor in the peritoneal fluid in infertile patients with endometriosis*. Tohoku J Exp Med 1994; 172:221-6.
54. Oosterlynck D, Meuleman M, Waer M, Koninckx P. *Transforming growth factor- β activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis*. Obstet Gynecol 1994; 83:287-92.
55. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis*. Hum Reprod 1996; 11:220-3.
56. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. *Role of cytokines in endometriosis*. Fertil Steril 2001; 76 (1):1-10.
57. Akoum A, Lemay A, Paradis I, Rheault N, Maheux R. *Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by*

- proinflammatory cytokines and sex steroids. Hum Reprod* 1996; 11:2269-75.
- 58.Laird SM, Li TC, Bolton AE. *The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture. Hum Reprod* 1993; 8:793-8.
 - 59.Tsuda T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Nagano Y, Ito M. *Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. Fertil Steril* 2000; 73:205-11.
 - 60.Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ. *Pathogenesis of endometriosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18 (2):233-44.
 - 61.Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. *Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? Trends Mol Med* 2003; 9 (5):223-8.
 - 62.Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. *Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. Hum Reprod* 1998; 13 (12):3496-502.
 - 63.Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. *Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. Fertil Steril* 1998; 69 (6):1042-47.
 - 64.Braun DP, Ding J, Shaheen F, Willey JC, Rana N, Dmowski WP. *Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. Fertil Steril* 2007; 87 (2):263-8.
 - 65.Van Der Linden PJ, De Goeij AF, Dunselman GA, Van Der Linden EP, Ramaekers FC, Evers JL. *Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. Fertil Steril* 1994; 61 (1):85-90.
 - 66.Van Der Linden PJ, De Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JL. *Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil Steril* 1995; 63 (6):1210-6.
 - 67.Pescetto G, De Cecco L, Pecorari D, Ragni N. *Endometriosis. In Ginecologia e Ostetricia*, 2006. Vol. 1, Cap. 15: p. 543.

68. Strathy J, Molgaard C, Coulam C, Melton LJ. *Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women.* Fertile Steril 1982; 38:667-72.
69. Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z, Dmowski WP. *Ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility.* Fertil Steril 1988; 50:716-20.
70. Mio Y, Toda T, Harada T, Terakawa N. *Luteinized unruptured follicle in the early stage of endometriosis as a cause of unexplained infertility.* Am J Obstet Gynecol 1992; 167:271-3.
71. Konninckx PR, De Moor P, Brosens IA. *Diagnosis of the luteinized unruptured follicle syndrome by steroid hormone assays on peritoneal fluid.* Br J Obstet Gynaecol 1980; 87:929-34.
72. Hirschowitz JS, Soler NG, Wortsman J. *The galactorrhea-endometriosis syndrome.* Lancet 1987; 1 (8070):896-8.
73. Balasch J, Vanrell JA. *Mild endometriosis and luteal function.* Int J Fertil 1985; 30:4-6.
74. Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, Hull MGR. *Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis.* J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:426-9.
75. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. *Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction.* Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 2):91-7.
76. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. *The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program.* Fertil Steril 1996; 65:603-7.
77. Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Freiberg J. *Is endometriosis an autoimmune disease?* Obstet Gynecol 1987; 70:115-22.
78. Muscato JJ, Haney AF, Weinberg JB. *Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis.* Am J Obstet Gynecol 1982; 144 (5):503-10.

79. Richter ON, Dorn C, Rosing B, Flaskamp C, Ulrich U. *Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis*. Arch Gynecol Obstet 2005; 271 (2):143-47.
80. American Society for Reproductive Medicine. *Revised American Fertility Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*. Fertil Steril 1997; 67 (5):817-21.
81. Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C. *Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium*. Fertil Steril 2009; 91 (6):2315-23.
82. Takehara M, Ueda M, Yamashita Y et al. *Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis*. Hum Pathol 2004; 35 (11):1369-75.
83. Ramon L, Gilabert- Estelles J, Castello R et al. *mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay*. Hum Reprod 2005; 20:272-8.
84. Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. *Matrix metalloproteinase and endometriosis*. Semin Reprod Med 2003; 21:155-64.
85. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. Nat Med 1998; 4 (3):336-40.
86. Gesher DM, Berndorff U, Meyhoefer-Malik A, Moubayed P, Malik E. *Immunolocalization of angiopoietin 1 in human peritoneal endometriotic lesions*. Ferti Steril 2004; 81 (Suppl 1):857-62.
87. Benirschke K, Kauffman P. *Architecture of normal villous tree*. In: *Pathology of the human placenta*. 4th ed. New York: Springer-Verlag; 2000 [chapter 7].
88. Huppertz B, Tewds DS, Kauffman P. *Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle*. Int Rev Cytol 2001; 205:215-53.
89. Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. *Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide*. Am J Pathol 1999; 154:1105:14.

90. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. *Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy.* Obstet Gynecol 1992; 80:283-5.
91. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. *The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure.* Hum Pathol 2003; 34:1265-75.
92. Kauffman P, Black S, Huppertz B. *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia.* Biol Reprod 2003; 69:1-7.
93. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. *Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies.* Am J Pathol 2003; 162:115-25.
94. Lyall F. *The human placental bed revisited.* Placenta 2002; 23:555-62.
95. Lyall F, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A, Robson SC. *Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction.* Am J Pathol 2001; 158:1713-21.
96. Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kauffman P, Huppertz B. *Preeclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast.* Placenta 2003; 24:540-8.
97. Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R. *Quantitative analysis of trophoblast invasion in pre-eclampsia.* Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82:722-9.
98. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, et al. *Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of pre-eclamptic woman.* Lab Invest 2001; 81:1143-52.
99. Foidart J. *Redistribution of the myometrial circulation in the uterus of women with pre-eclampsia or intrauterine growth retardation.* Workshop 1-9th Meeting of the International Federation of Placenta Association, Maintz-Gissen, Germany, 2003.
100. Pardi G, Cetin I, Marconi AM, et al. *Venous drainage of the human uterus: respiratory gas studies in normal and fetal growth retarded pregnancies.* Am J Obstet Gynecol 1992; 166:699-706.

101. Hemberger M, Nozaki T, Masutani M, Cross JC. *Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion*. Dev Dyn 2003; 227:185-91.
102. Steer P. *Factors influencing relative weight of placenta and newborn infant. Maternal haemoglobin and blood pressure should have been regarded as continuous variables*. Br Med J 1997; 315:1542.
103. Reister F, Kingdom JCP. *Screening for pre-eclampsia*. In: Baker PN, Kingdom JC, eds. *Pre-eclampsia: current perspectives on management*. London: Partheon; 2004: p. 119-32.
104. Krebs C, Macara ML, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC. *Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree*. Am J Obstet Gynecol 1996; 175:1534-42.
105. Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. *The development of the human placental villous tree*. Anat Embryol (Berl) 1990; 181:117-28.
106. Kohnen G, Castellucci M, Hsi BL, Yea CJ, Kaufmann P. *The monoclonal antibody GB42. A useful marker of the differentiation of myofibroblast*. Cell Tissue Res 1995; 281:231-42.
107. Jackson MR, Walsh AJ, Morrow RJ, Mullen JB, Lye SJ, Ritchie JW. *Reduced placental villous tree elaboration in small for gestational age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms*. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:518-525.
108. Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell 1996; 86:353-64.
109. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. *The human gene of vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem 1991; 266:11947-54.
110. Olofsson B, Pajlusola K, Kaipainen A, et al. *Vascular endothelial growth factor B. A novel growth factor for endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:2576-81.
111. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-GC, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-“) receptor tyrosine kinases*. EMBO 1996; 15:290-8.

112. Yamada Y, Nezu JI, Shimane M, et al. *Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D*. Genomics 1997; 42:483-88.
113. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed for a single gene of chromosome 14*. Oncogene 1993; 8:925-31.
114. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, et al. *Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic*. Lab Invest 1997; 76:517-31.
115. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, et al. *Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta*. J Reprod Fertil 1993; 99:609-15.
116. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, et al. *Localization of VEGF and expression of its receptors Flt and KDR in human placenta throughout pregnancy*. Hum Reprod 1996; 11:1090-8.
117. Charnock-Jones DS, Sharley AM, Boocock CA, et al. *Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells*. Biol Reprod 1994; 51:524-530.
118. Shih SC, Claffey KP. *Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression*. Growth Factors 2001; 19:19-34.
119. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. *Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability*. FEBS Lett 1995; 370:203-8.
120. Zhang EG, Smith SH, Charnock-Jones DS. *Placental expression of human angiopoietin-2 and TIE-2 but not angiopoietin-1 or TIE-1, are regulated during gestation*. J Soc Gynecol Invest 1999; 6:86a.
121. Tatemoto K. *Neuropeptide Y: complete aminoacid sequence of the brain peptide*. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:5485.
122. Petraglia F, Calzà L, Giardino L, et al. *Identification of immunoreactive neuropeptide Y in human placenta: localization, secretion and binding sites*. Endocrinology 1989; 124:2016.
123. Petraglia F, Volpe A, Genazzani AR, et al. *Neuroendocrinology of human placenta*. Front Neuroendocrinol 1990; 11:6.
124. Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. *Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms*. Endocr Rev 1996; 17:156-186.

125. Gibbins IL, Jobling P, Morris JL. *Functional organization of peripheral vasomotor pathways*. Acta Physiol Scand 2003; 177:237-45.
126. Hill JM, McCune S, Alvero RJ, Glazner GW, Henins KA, Stanziale SF, Keimowitz JR, Brenneman DE. *Maternal vasoactive intestinal peptide and the regulation of embryonic growth in the rodent*. J Clin Invest 1996; 97:202-208.
127. Sreedharan SP, Huang J-X, Cheung M-C, Goetzl EJ. *Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:2939-2943.
128. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS 1990 *Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts*. J Biol Chem 1990; 265:10274-10281.
129. Ottesen B, Fahrenkrug J. *Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance*. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:1615-1631.
130. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, et al. *Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release*. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:2378-83.
131. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC III, Hauth JC. *Hypertensive disorders in pregnancy*. In Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, et al., eds. Williams Obstetrics, 19th edn. Stamford. CT: Appleton and Lange, 1997:693-744.
132. Redman CWG. *Current topic: preeclampsia and the placenta*. Placenta 1991; 12:301-8.
133. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. *Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblast to mimic a vascular adhesion phenotype*. J Clin Invest 1997; 99:2152-64.
134. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. *Trophoblast invasion of human deciduas from 8 to 18 weeks of pregnancy*. Placenta 1980; 2:303-16.
135. Campbell S, Diaz-Recasens J, Griffin DR, et al. *New Doppler technique for assessing uteroplacental blood flow*. Lancet 1983; 1:675-7.

136. Fleischer A, Schulman H, Farmakides G, et al. *Uterine artery Doppler velocimetry in pregnant women with hypertension*. Am J Obstet Gynecol 1986; 154:806-13.
137. Campbell S, Pierce JMF, Hackett G, Cohen-Overbeek T, Hernandez C. *Qualitative assessment of utero-placental blood flow: an early screening test for high risk pregnancies*. Obstet Gynecol 1986; 68:649-53.
138. Arduini D, Rizzo G, Romanini C, Mancuso S. *Utero-placental blood flow-velocity waveforms as predictors of pregnancy-induced hypertension*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1987; 26:335-41.
139. Kingdom JC, Kaufmann P. *Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia*. Placenta 1997; 18:613-21.
140. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. *VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia*. Br J Obstet Gynaecol 1996; 103:1191-6.
141. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA. *Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery*. Placenta 1997; 18:269-76.
142. Pardi G, Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, et al. *Venous drainage of the human uterus: respiratory gas studies in normal and fetal growth-retarded pregnancies*. Am J Obstet Gynecol 1992; 166:699-706.
143. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, et al. *Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction*. Lab Invest 1999; 79:151-70.
144. Kroll J, Waltenberger J. *VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor 2 (KDR)*. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252:743-6.
145. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. *Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells*. J Biol Chem 1999; 274:15732-9.
146. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. *Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and*

- intrauterine growth restricted pregnancies.* Hum Reprod 1997; 12:167-172.
147. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. *Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 activate trophoblast TIE-2 to promote growth and migration during placental development.* Am J Pathol 2000; 156:2185-99.
 148. Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Lavy Y, Yagel S. *TIE-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor-ligand model for vascular remodeling.* Mol Hum Reprod 2000; 6:81-7.
 149. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. *Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro.* Curr Biol 1999; 8:529-32.
 150. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. *Angiopoietin 2, a natural antagonist for TIE-2, that disrupts in vivo angiogenesis.* Science 1997; 277:50-60.
 151. Todros T, Ferrazzi E, Girolì C et al. *Fitting growth curve to head and abdominal measurements of the fetus: a multicentric study.* J Clin Ultrasound 1987; 15:95-105.
 152. Parazzini F, Cortiriovis I et al. *Standard di peso alla nascita in Italia.* Ann Ost Gin Med Perinatol 1999; CXII:203-246.
 153. Wathén KA, Tuutti E, Stenman UH, Alfthan H, Halmesmäki E, Finne P, Ylikorkala O, Vuorela P. *Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation.* J Clin Endocrinol Metab 2006; 91:180-4.
 154. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, Morris NH, Smith SK. *Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia.* Eur J Clin Invest 1996; 26:1182-5.
 155. Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Tzonou A, Makrakis E, Nikolaou KE, Hassiakos D. *Angiopoietin-2 in the perinatal period and the role of intrauterine growth restriction.* Acta Obstet Gynecol Scand 2006; 85:45-8.
 156. Hagen AS, Orbus RJ, Wilkening RB, Regnault TR, Anthony RV. *Placental expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and tie-2 during*

placental development in an ovine model of placental insufficiency-fetal growth restriction. Pediatr Res 2005; 58(6):1228-32.

157. Dötsch J, Nüsken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. *Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation.* J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2755-8.
158. Kokot F, Ulman I, Wiecek A, Irzyniec T, Ulman J. *Concentrations of leptin and neuropeptide Y in maternal plasma, umbilical cord blood and in amniotic fluid in pregnant women with EPH-gestosis.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1998; 46:311-6.
159. Rajakumar PA, He J, Simmons RA, Devaskar SU. *Effect of uteroplacental insufficiency upon brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression and concentrations.* Pediatr Res 1998; 44:168-74.
160. Holst N, Oian P, Aune B, Jenssen TG, Burhol PG. *Increased plasma levels of vasoactive intestinal polypeptide in pre-eclampsia.* Br J Obstet Gynaecol 1991; 98:803-6.
161. Sader MA, Celermajer DS. *Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system.* Cardiovasc Res 2002; 53:597-604.
162. Plank MJ, Sleeman BD, Jones PF. *The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis.* Growth Factors 2004; 22:1-11.

CAPITOLO 5 - PUBBLICAZIONE SCIENTIFICA

1) Giovanni A. Tommaselli, M.D., Ph.D., Giuseppe Cerrota, M.D.; Costantino Di Carlo, M.D.; Paola Di Iorio, M.D., Giuseppe Bilfulco, Ph.D., M.D.; Carmine Nappi, M.D. *Placental expression of VEGF, angiopoietins and vasoactive peptides in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation*. Submitted to Fertil Steril.

Manuscript Number:

Title: Placental expression of VEGF, angiopoietins and vasoactive peptides in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation

Article Type: Original Article

Section/Category:

Keywords: Intrauterine growth retardation, VEGF, Angiopoietins, NPY, SP, VIP

Corresponding Author: Dr. Giovanni A. Tommaselli, Ph.D, M.D.

Corresponding Author's Institution: University of Naples Federico II

First Author: Giovanni A. Tommaselli, Ph.D., M.D.

Order of Authors: Giovanni A. Tommaselli, M.D., Ph.D., Giuseppe Cerrota, M.D.; Costantino Di Carlo, M.D.; Paola Di Iorio, M.D., Giuseppe Bilfulco, Ph.D., M.D.; Carmine Nappi, M.D.

Abstract: Objective: To evaluate VEGF, ANGPT1 and ANGPT2 expression in the trophoblast from normal pregnancies and pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. To verify if an insufficient trophoblastic invasion may be involved in determining IUGR, we also evaluated possible relationships between these angiogenic factors and vasoactive peptide. Setting: Department of Obstetrics and Gynecology of the University of Naples Federico II. Patients: Twenty women with uncomplicated singleton pregnancies and 10 women with singleton pregnancies complicated by asymmetric fetal growth restriction. Main outcome measures: Immunolocalization of VEGF, Angiopoiein-1, Angiopoiein-2, VIP, SP and NPY in human placental trophoblast sampled after cesarean section. VEGF, Angiopoiein-1, Angiopoiein-2, VIP, SP and NPY mRNA expression in placental trophoblast evaluated by RT-PCR. Results: VEGF, Angiopoietins, VIP, and SP contents as evaluated by immunolocalization were significantly lower in IUGR complicated pregnancies in comparison with normal pregnancies, as well as mRNA expression. NPY content and expression was significantly higher in IUGR complicated pregnancies. Conclusions: Placental insufficiency causing IUGR is characterized by a decrease in

angiogenic factors and vasodilating peptides, indicating an abnormal placental development and a vasoconstrictive state of placental circulation.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Abstract

Objective: To evaluate VEGF, ANGPT1 and ANGPT2 expression in the trophoblast from normal pregnancies and pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. To verify if an insufficient trophoblastic invasion may be involved in determining IUGR, we also evaluated possible relationships between these angiogenic factors and vasoactive peptide.

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology of the University of Naples Federico II.

Patients: Twenty women with uncomplicated singleton pregnancies and 10 women with singleton pregnancies complicated by asymmetric fetal growth restriction.

Main outcome measures: Immunolocalization of VEGF, Angiopoiein-1, Angiopoiein-2, VIP, SP and NPY in human placental trophoblast sampled after cesarean section. VEGF, Angiopoiein-1, Angiopoiein-2, VIP, SP and NPY mRNA expression in placental trophoblast evaluated by RT-PCR.

Results: VEGF, Angiopoietins, VIP, and SP contents as evaluated by immunolocalization were significantly lower in IUGR complicated pregnancies in comparison with normal pregnancies, as well as mRNA expression. NPY content and expression was significantly higher in IUGR complicated pregnancies.

Conclusions: Placental insufficiency causing IUGR is characterized by a decrease in angiogenic factors and vasodilating peptides, indicating an abnormal placental development and a vasoconstrictive state of placental circulation.

Key words: IUGR, VEGF, Angiopoietin, VIP, SP, NPY, trophoblast

Placental expression of VEGF, angiopoietins and vasoactive peptides in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation

Giovanni A. Tommaselli, M.D., Ph.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Giuseppe Cerrota, M.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Costantino Di Carlo, M.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Paola Di Iorio, M.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Giuseppe Bilfulco, Ph.D., M.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Carmine Nappi, M.D. Department of Obstetrics and Gynecology – University of Naples “Federico II”

Corresponding Author: Giovanni A. Tommaselli
Department of Obstetrics and Gynecology
University of Naples “Federico II”
Via S. Pansini, 5
80131 Naples, Italy
Phone: +390817462903
Fax: +390817462905
e-mail: gtommaselli@yahoo.it

Introduction

Fetal growth restriction is a complicated perinatal condition, with multiple causes. It shares common pathophysiologies with other important disorders, such as preeclampsia and abruption. As a group, these conditions associated with ischemic placental disease are responsible for a large percentage of indicated preterm births (1-3). The ability to accurately predict, diagnose and manage these pregnancies has significant and far-reaching implications, including potential effects on long-term adult health.

Placental ischemia is the most common cause of fetal growth restriction. Alterations in placental development are being linked to various angiogenic mediators, which may be of future use in early risk-determination.

Regulation of placentation is very complex and several different, but ultimately linked, biological processes are important. One aspect that has gained in importance is the requirement for adequate placental vascularity. Angiogenesis is required for early implantation and placentation to be successful (4) and it is likely that human gestation is dependent upon at least three temporally different vascular processes: (1) adequate uterine angiogenesis/vascularity at the time of implantation, (2) development and expansion of the villous vasculature soon after implantation and (3) remodeling of the maternal uterine circulation near the maternal-fetal interface (5). Consequently, it is possible that disruption of these early vascular events may contribute to the pathophysiology of conditions like spontaneous abortion (6), preeclampsia or growth retardation of the fetus (7,8).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important vasoactive growth factor, increasing vascular permeability and inducing endothelial cell activation. VEGF, binding its R2 receptor, promotes mesodermic cells differentiation into endothelial cells and, binding its R1 receptor, regulates the development of tubular capillaries (9).

Angiopoietin-1 (ANGPT1) is a cytokine able to amplify the effects of other angiogenic factors, mainly VEGF (10). It is unable to independently activate angiogenesis. Angiopoietin-2 (ANGPT2) is the endogenous antagonist of ANGPT1, binding the same receptor (11). This receptor, called TIE-2 (tunica interna cell kinase-2), belongs to tyrosine-kinase family (12). ANGPT1 is expressed by endothelial cells and several tumoral non-endothelial cell-lines (11,13).

A series of neuropeptides have been demonstrated to be produced by the human placenta. Among them, neuropeptide Y (14,15), vasoactive intestinal peptide (16-18) and substantia P (SP) (18), which display vasoactive properties, the first being vasoconstrictive and the latter vasodilatative.

It can be hypothesized that a deficit of angiogenetic factor could represent the first step of altered placentation that leads to pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction and that an alteration of vasoactive peptide at the placental site could participate in determining and maintaining the hypoxic state that characterizes these pathologies.

This study is aimed to evaluate VEGF, ANGPT1 and ANGPT2 expression in the trophoblast from normal pregnancies and pregnancies complicated by intrauterine growth retardation in order to verify if a deficiency in these angiogenic factors may have a role in the pathogenesis of IUGR. To verify if an insufficient trophoblastic invasion may be involved in determining IUGR, we also evaluated possible relationships between these angiogenic factors and vasoactive peptide

Materials and Methods

Twenty women with uncomplicated singleton pregnancies and 10 women with singleton pregnancies complicated by asymmetric fetal growth restriction, all with normal pregravid BMI (20–27 kg/m²), were consecutively enrolled from the outpatient clinic of our department. The diagnosis of fetal growth restriction was made when the was below the tenth percentile of reference values for fetuses of similar age in Italy (19). Fetal growth restriction diagnosis was confirmed at birth if birth weight was below the tenth percentile according to Italian standards for birth weight and gestational age (20). The study was approved by our institutional review board. All patients gave their informed and written consent for participation in the study. All ultrasonographic measurements were performed by the same operator (GAT) with the use of a Toshiba Powervision 6000 with a 5-MHz transabdominal convex probe (Toshiba Medical Systems, Rome, Italy). A maximum of 7 days elapsed between the final ultrasonography and births. At the moment of delivery, a placental cotyledon was sampled and divided into two parts, one immediately fixed in formalin for immunohistochemical studies, the second immediately frozen and stored at -80°C for Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis.

On all samples, VEGF, ANGPT1, ANGPT2, VIP, SP and NPY content and their mRNAs were assessed by immunohistochemical staining and RT-PCR analysis, respectively. Formalin-fixed samples for immunihistochemistry were paraffin-embedded and all sections were prepared for histology slides.

Immunohistochemistry

Antisera

The following monoclonal and polyclonal antibodies were used as primary antisera: rabbit anti-VEGF 1:100 (Sigma, St. Louis, MO), goat anti-ANGPT1 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-ANGPT2 1:300 (Santa Cruz

Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), human anti-VIP (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA), mouse anti-SP (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA). Biotinylated goat anti-mouse IgG (Becton & Dickinson, Milan, Italy) and goat anti-rabbit IgG (Calbiochem, Milan, Italy) were used as secondary antisera, at the dilution of 1/200 and 1/20.000, respectively. Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used to reveal the antibody-antigen complexes.

Immunoenzymatic method

After deparaffinization, serial sections were fixed with acetone (4°C) for 10 minutes, air dried and circled with wax-pen (Dako, Carpinteria CA). Endogenous peroxidase was inhibited by 0.3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes. Positive control breast and brain sections were processed in the same way. Sections were then rinsed 3 times in PBS at pH 7.3 for 5 minutes and incubated for 10 minutes with normal goat serum (NGS) at the dilution of 1:20 and then overnight at room temperature with the primary antisera. Negative control sections were incubated with normal rabbit serum (NRS) while unrelated antisera such as monoclonal mouse anti-insulin 1:1.500 (Sigma, St. Louis, MO) and polyclonal rabbit anti-glucagon 1:3.000 (Chemicon, Milano, Italia) were used to stain pancreatic tissue as a positive control for the immunoenzymatic reaction.

Nickel-sulfate enhancement with di-amino-benzidine chromogen (DAB) in the presence of 0.03% H₂O₂, was used to enzymatically reveal the antigens. Sections were counterstained with haematoxylin.

Computerized analysis of the image

An advanced software for the analysis of images (Quantimet 520, Leica, Germany) was used to quantify the immunopositivity of sections. Images were directly acquired by Leitz Axiophot optic microscope (Leitz, Germany) at 20X enlargement using a

specialized video camera (DC 200, Leica, Germany). The histological examined areas were digitized and successively processed. The optic quality of these areas was optimized by modifying the brilliance and the contrast. The immunoreactive areas were highlighted by the program on the basis of their levels of gray and measured. The surface occupied by antigens was expressed as percentage of areas positive for the specific immunohistochemical reaction in comparison with the total examined area (positive pixels/total pixels). This measurement was realized on 5 sections for each biopsy and six fields were analyzed per section. The mean value of antigen amount derived by the analysis of all areas in the 5 sections was reported. Sections were examined and graded by three independent observers, blinded to the patient treatment and hormonal status.

Semiquantitative RT-PCR

RT-PCR was used to analyze target gene expression. Total RNA was isolated by lysing the frozen samples (150-300 mg) in Trizol solution (Life Technologies, GIBCO BRL) according to the supplier's protocol. RNA was precipitated and quantified by spectroscopy. A 2 mg of total RNA of each sample was reversely transcribed using the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the protocol supplied by the manufacturer. The random hexamer primers provided in the kit were used. The same cDNA product obtained from each sample was used for subsequent PCR amplification with the primer sets prepared for the target gene and glyceraldehydes phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene. The amplification of the GAPDH gene was used as double internal control. The ratio between the samples and the housekeeping gene was calculated to normalize for initial variations in sample concentration and as a control for reaction efficiency. To prevent quantitative inaccuracies deriving from competitive effects and different efficiency and

ranges of amplification of the cDNAs, the target genes and GAPDH cDNAs generated in the same RT reaction were amplified in separate tubes containing increasing volumes of the RT reaction (1, 2, 4 and 8 μ l) to document amplification in the linear region for each cDNA. Primer sequences were designed using the software Primer 3 (developed by Steve Rozen and Helen J Skaletsky) available on-line at <http://www-genome.wi.mit.edu>. Semiquantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in a 50 μ l reaction volume, with reagent concentration and conditions so that there was no competition between target and standard. It is important to select the appropriate number of cycles so that the amplification product is clearly visible on an agarose gel and can be quantified, but also so that amplification is in the exponential range and has not reached a plateau yet. The optimal number of cycles has to be in the same range for the specific RNA of interest. When the annealing temperature of the two primer sets was different, annealing temperatures ranging between the optimal temperature of each primer set were tested. The reaction mixture contained 3 μ l of cDNA, 10-20 pmol of each primer, 200 mM each of dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$ and 1 unit of Taq polymerase with the reaction buffer supplied with the kit. Amplification was carried out in a Techgene Thermal Cycler (Techgene, Crackler Scientific Inc., USA) using the following conditions: 95°, 5 min initial denaturing phase; 95° C, 1 min; 55° C, 1 min; 72° C, 1 min for 18-24 cycles; 72° C, 10 min, final extension. In each experiment, possible DNA contamination was determined by a control reaction in which cDNA was omitted from the reaction mixture and replaced by DNase and RNase free water. The amplified products (12 μ l of each sample) were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel containing ethidium bromide, followed by photography under ultraviolet illumination. The levels of target mRNA were estimated by densitometric scanning and normalized against GAPDH loading controls. Densitometric analyses of the PCR products were performed using the ImageJ v1.29

software (developed by Wayne Rasband) available on-line at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. The densitometric values for the amount of PCR products generated by the increasing volume of RT reaction were averaged to yield the target genes and GAPDH signals for each sample (densitometric units/ μ l RT reaction). The data are summarized with the mean \pm SD. All PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) and their identities verified by automated DNA forward and reverse sequencing using a dideoxy terminator reaction chemistry for sequence analysis on the Applied biosystem Model 373A DNA sequencer.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Science version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A Shapiro-Wilk's W test was performed to evaluate data distribution and all variables displayed a normal distribution. A Student's *t*-test for paired samples was used to assess differences between cyst tissue and endometrial tissue of the same patient, while a Student's *t*-test for uncoupled samples was used to evaluate differences between affected subjects and controls.

Results

Characteristics of the patients are reported in Table 1. No statistical difference was observed between group A and group B in age, and BMI. Mean birth weight of newborns and placental weight from group B were significantly lower compared with newborns from group A, as well as gestational age ($p < 0.05$). There was a similar number of female and male infants in both groups.

Immunohistochemical analysis (Table 2; Fig. 1) showed a VEGF (Fig. 2), Ang-1 (Fig. 3), Ang-2, SP and VIP (Fig. 4) expression significantly higher ($p < .01$) in placentas from normal pregnancies in comparison with IUGR complicated pregnancies, while NPY levels were found to be significantly lower ($P < .01$) (Fig. 5).

RT-PCR analysis (Table 3; Fig. 6) revealed VEGF (Fig. 2), Ang-1 (Fig. 3), Ang-2, SP and VIP (Fig. 4) mRNA to be significantly higher in placentas from normal pregnancies (Table). NPY mRNA levels were significantly higher in IUGR complicated pregnancies (Fig. 5).

Discussion

In this study, angiogenic factors and vasodilating peptides are less expressed in placenta from pregnancies complicated by IUGR. Furthermore, NPY, a vasoconstrictive neuropeptide expressed by the placenta, is expressed in amounts significantly higher in pathologic placentas.

It has been demonstrated that pre-eclampsia and/or IUGR are a result of inadequate placentation and consequent hypoxia. Angiogenic factors as VEGF and angiopoietin-1 are essential for a normal placental development (1-3), with VEGF increasing vascular permeability and inducing activation of endothelial cells and angiopoietin-1 amplifying the effects of VEGF, while the actions of angiopoietin-2 are less understood. A deficit in VEGF and angiopoietin may be the first step in determining an insufficient placental development that may induce hypoxic states leading to IUGR and/or pre-eclampsia.

Data on the expression of VEGF and angiopoietin from placentas derived from pregnancies complicated by IUGR are in accordance with our results. Maternal serum levels of VEGFR1 at 16-20 weeks' gestation are elevated in patients that develop severe pre-eclampsia or IUGR (21). This increase of the soluble receptor may neutralized VEGF and contribute to inadequate placentation. Furthermore, Cooper et al. (22) demonstrated a reduction of VEGF mRNA in placentas from pregnancies complicated by pre-eclampsia, and Lyall found a similar results in IUGR (23).

To our knowledge, this is the first report of the expression of Ang-1 and Ang-2 from human placentas complicated by IUGR. Malamitsi-Puchner et al. (24) evaluated cord blood and newborn serum Ang-2 concentrations in IUGR, founding no difference in comparison with AGA infants. On the contrary, Hagen et al. (25) showed a reduction of Ang-1 and Ang-2 in late gestation in a ovine model of IUGR.

Data on vasoactive peptides in pregnancies complicated by IUGR are very limited, and most of them regard pre-eclampsia. Dotsch et al. (26) showed NPY mRNA levels significantly lower in normal pregnancies in comparison with pre-eclamptic women, while Kokot et al (27) found elevated cord blood NPY levels in physiologic pregnancies in comparison with pre-eclamptic pregnancies. VIP mRNA levels has been show to be higher pre-eclampsia in comparison with normal pregnancies (28,29). No data on SP in IUGR complicated pregnancies seems to be available.

In conclusion, from our data from patients with IUGR complicated pregnancies caused by placental insufficiency, there seems to be a scenario characterized by a general reduction of angiogenic factor and vasoactive vasodilant peptides, indicated a presence of a reduced placental neoangiogenesis and a vasoconstrictive response a the maternal-fetal interaface.

These data are in part in contrast with the existing data. It must be considered that placental insufficiency has clinical presentation that are profoundly different, going from subclinical picture to severe pre-eclampsia and/or IUGR. The selection of patients and the severity of the pathology can easily explain these discrepancies, as well as the different degree of the pathological process observed. Indeed, it can be hypothesized that, studying a IUGR complicated pregnancy, it can be observed at a stage where compensatory mechanisms are present or when they have ceased their effects. Another hypothesis that can be formulated is that these discrepancies are due to differences in gestational ages (IUGR complicated pregnancies tend to be terminated earlier), birthwieght and/or placental weight.

In conclusion, placental insufficiency leading to IUGR is characterized by a low expression of angiogenic factor and vasodilating peptides and high expression of NPY, a vasoconstrictive peptide, leading to insufficient placental development and vasoconstriction that induce placental hypoxia.

References

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365:785-99.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367:1066-74.
3. Montan S, Sjoberg NO, Svenningsen N. Hypertension in pregnancy — fetal and infant outcome: a cohort study. *Clin Exp Hypertens — Part B Hypertens Pregnancy* 1987; 6:337-48.
4. Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997; 3:443-446.
5. Torry RJ, Schwartz JS, Torry DS. Vascularization of the placenta. In *Cardiovascular Molecular Morphogenesis: Assembly of the Vasculature and its Regulation*, RJ Tomanek (ed.), New York, NY, Springer-Verlag, 2002.
6. Torry DS, Labarrere CA, McIntyre JA. Uteroplacental vascular involvement in recurrent spontaneous abortion. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10:379-382.
7. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:1049-1059.
8. Starzyk KA, Pijnenborg R, Salafia CM. Decidual and vascular pathophysiology in pregnancy compromise. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17:63-72.
9. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39:469-78.
10. Plank MJ, Sleeman BD, Jones PF. The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis. *Growth Factors* 2004; 22:1-11.

11. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277:55-60.
12. Kobayashi H, Lin PC. Angiopoietin/Tie2 signaling, tumor angiogenesis and inflammatory diseases. *Front Biosci* 2005; 10:666-74.
13. Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik A, Malik E. Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 2004; 81:869-75.
14. Petraglia F, Volpe A, Genazzani AR, et al. Neuroendocrinology of human placenta. *Front Neuroendocrinol* 1990; 11:6.
15. Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 1996; 17:156-186.
16. Sreedharan SP, Huang J-X, Cheung M-C, Goetzl EJ. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2939-2943.
17. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS 1990 Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts. *J Biol Chem* 1990; 265:10274-10281.
18. Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1615-1631.
19. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, et al. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2378-83.

20. Todros T, Ferrazzi E, Girolì C, Nicolini U, Parodi L, Pavoni M, et al. Fitting growth curves to head and abdomen measurements of the fetus: A multicentric study. *J Clin Ultrasound* 1987; 15:95-105.
21. Parazzini F, Cortinovis I, Bortolus R, Fedele L. Standard di peso alla nascita in Italia. [Birth weight standards in Italy] *Ann Ost Gin Med Perinat* 1991; CXII:203-46.
22. Wathén KA, Tuutti E, Stenman UH, Alftan H, Halmesmäki E, Finne P, Ylikorkala O, Vuorela P. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:180-4.
23. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996; 103:1191-6.
24. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta*. 1997; 18:269-76.
25. Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Tzonou A, Makrakis E, Nikolaou KE, Hassiakos D. Angiopoietin-2 in the perinatal period and the role of intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006; 85:45-8.
26. Hagen AS, Orbus RJ, Wilkening RB, Regnault TR, Anthony RV. Placental expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and tie-2 during placental development in an ovine model of placental insufficiency-fetal growth restriction. *Pediatr Res*. 2005; 58:1228-32.
27. Dötsch J, Nüsken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:2755-8.

28. Kokot F, Ulman I, Wiecek A, Irzyniec T, Ulman J. Concentrations of leptin and neuropeptide Y in maternal plasma, umbilical cord blood and in amniotic fluid in pregnant women with EPH-gestosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998; 46:311-6.
29. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS 1990 Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts. *J Biol Chem* 1990; 265:10274–10281.
30. Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1615–1631.

Table 1. Characteristics of patients. * = $p < 0.05$ vs. group B.

Variables	Group A	Group B
	($n = 20$)	($n = 10$)
Age (years)	31.2 ± 6.0	28.9 ± 9.1
BMI (kg/m^2)	25.1 ± 1.0	25.0 ± 1.3
Neonatal birthweight (g)	$2928.7 \pm 386.4^*$	1543.3 ± 181.7
Placental weight (g)	$552 \pm 21^*$	391 ± 15
Males/females	9/11	4/6
Smokers (%)	60%	60%

Table 2. Immunolocalization of angiogenic factors and vasoactive peptides in placentas from normal pregnancies and IUGR complicated pregnancies.

	Normal	IUGR	<i>P</i>
	($n = 20$)	($n = 10$)	
VEGF	1.81 ± 0.22	1.36 ± 0.23	< 0.01
Ang-1	1.64 ± 0.19	1.37 ± 0.16	< 0.01
Ang-2	1.56 ± 0.16	1.27 ± 0.15	< 0.01
VIP	1.61 ± 0.13	1.32 ± 0.16	< 0.01
SP	1.61 ± 0.12	1.32 ± 0.11	< 0.01
NPY	0.87 ± 0.29	1.53 ± 0.10	< 0.01

Table 3. mRNA expression of angiogenic factors and vasoactive peptides evaluated with RT-PCR in placentas from normal pregnancies and IUGR complicated pregnancies.

	Normal (<i>n</i> = 20)	IUGR (<i>n</i> = 10)	<i>P</i>
VEGF	1.31±0.25	1.02±0.13	< 0.01
Ang-1	1.35±0.21	1.06±0.11	< 0.01
Ang-2	1.32±0.12	0.98±0.05	< 0.01
VIP	1.41±0.13	1.12±0.17	< 0.01
SP	1.431±0.16	1.04±0.12	< 0.01
NPY	0.77±0.19	1.34±0.14	< 0.01

Legenda of figures.

Figure 1. Immunolocalization of VEGF, Ang-1, Ang-2, VIP, SP and NPY. $P < 0.01$ for all values, S100 excluded.

Figure 2. A. Immunostaining of VEGF in IUGR complicated pregnancies. B. Immunostaining of VEGF in normal pregnancies. C. RT-PCR analysis of VEGF expression.

Figure 3. A. Immunostaining of Ang-1 in IUGR complicated pregnancies. B. Immunostaining of Ang-1 in normal pregnancies. C. RT-PCR analysis of Ang-1 expression.

Figure 4. A. Immunostaining of VIP in IUGR complicated pregnancies. B. Immunostaining of VIP in normal pregnancies. C. RT-PCR analysis of VIP expression.

Figure 5. A. Immunostaining of NPY in IUGR complicated pregnancies. B. Immunostaining of NPY in normal pregnancies. C. RT-PCR analysis of NPY expression.

Figure 6. RT-PCR analysis of VEGF, Ang-1, Ang-2, VIP, SP and NPY mRNA expression. $P < 0.01$ for all values, S100 excluded.

Fig. 1

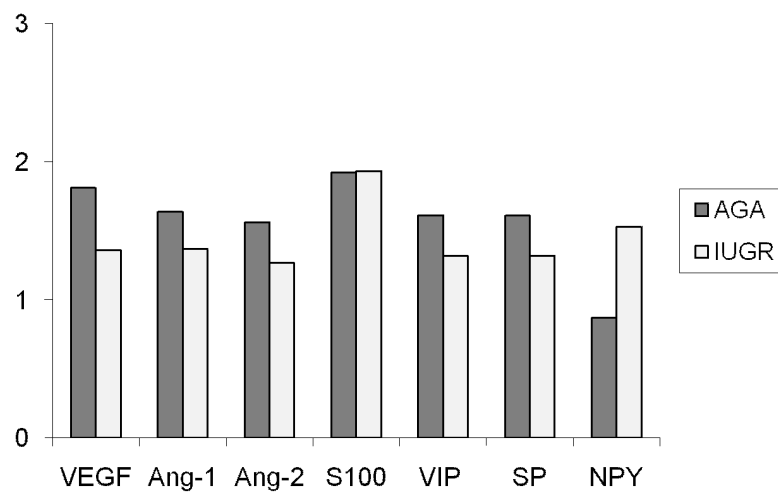
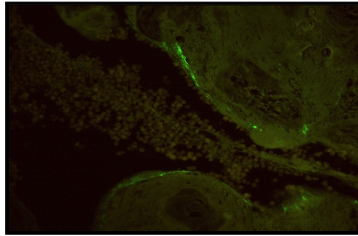
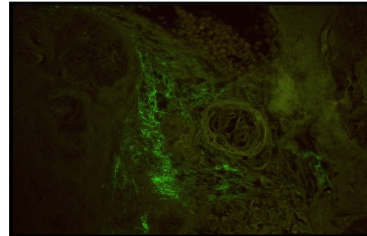


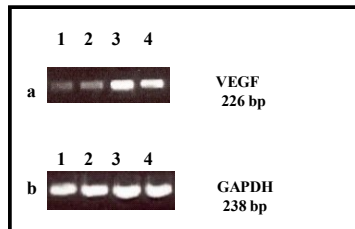
Fig. 2



A

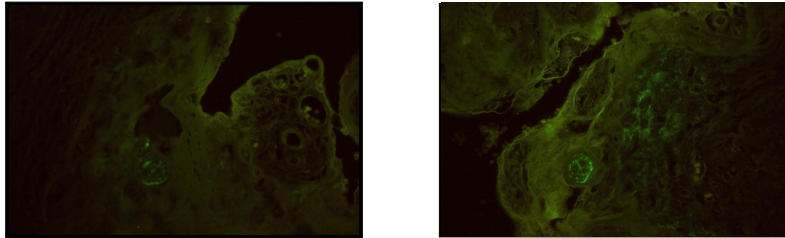


B



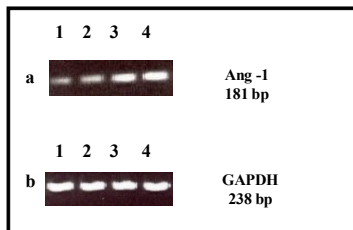
C

Fig. 3



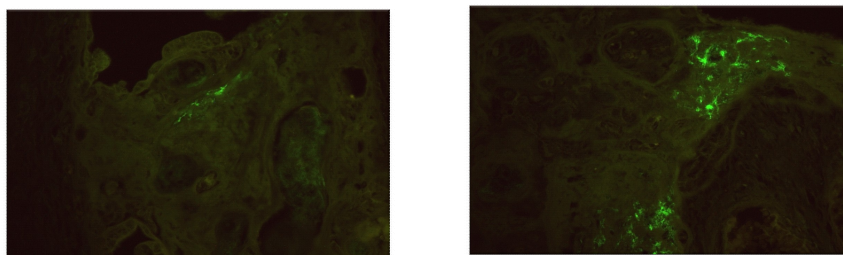
A

B



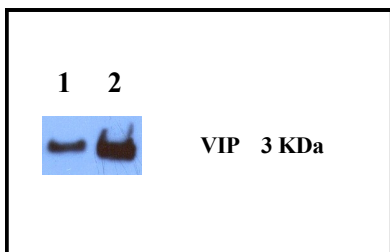
C

Fig. 4



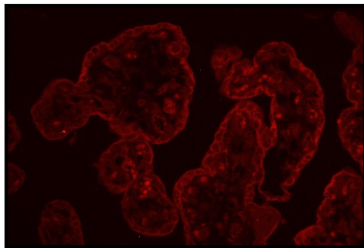
A

B

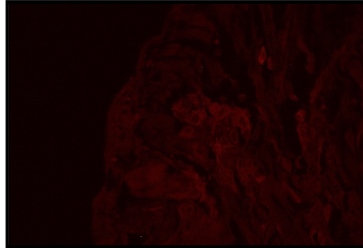


C

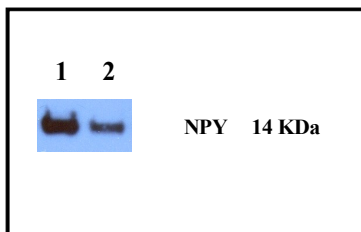
Fig. 5



A



B



C

Fig. 6

